

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**Les régions 3' non-traduites (3'UTRs) de l'ARNm de la calpastatine : Leur
organisation, structure et implication dans des interactions
de type ARN-protéine**

Par :

Moulay Driss Rochdi

Service de rhumatologie

Mémoire présenté à la faculté de médecine

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M. Sc.) en immunologie



National Library
of Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

Acquisitions et
services bibliographiques

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-612-86685-8

Our file Notre référence

ISBN: 0-612-86685-8

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

Canada

TABLE DES MATIERES

	PAGES
Sommaire.....	i
Listes des illustrations.....	v
Listes des tableaux.....	vii
Listes des abréviations.....	viii
Résumé.....	2
 <u>1.0 INTRODUCTION</u>	 5
 1.1 Le système calpaïne-calpastatine	 5
1.1.1 Les calpaïnes.....	5
1.1.2 Les substrats des calpaïnes.....	10
1.1.3 Mécanisme d'activation des calpaïnes.....	11
1.1.4 Fonctions des calpaïnes.....	12
1.1.5 L'inhibiteur endogène des calpaïnes : la calpastatine.....	14
1.1.6 L'autoimmunité et la calpastatine.....	18
1.1.7 Diversité structurale de la calpastatine.....	19
 1.2 La région 3'UTR	 22
1.2.1 Les 3'UTRs et stabilité des ARNm.....	25

1.2.1.1 Mécanisme de dégradation dépendant de la queue Poly(A).....	26
1.2.1.2 Les éléments AU-riche (ARE).....	26
1.2.1.3 Mécanismes de dégradation poly(A)-indépendants.....	27
1.2.1.4 Dégradation des ARNms par les endonuléases.....	28
1.2.2 Les 3'UTRs et le contrôle de la traduction.....	33
1.2.3 Les 3'UTRs et la localisation des ARNms.....	34
1.2.4 Interaction entre les extrémités 5' et 3' des ARNms.....	36
1.3 Hypothèses de travail.....	37
<u>2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</u>	38
2.1 Extraction de l'ARN total.....	38
2.2 Réaction de transcription inverse (RT).....	38
2.3 Amplification des régions 3' non-codantes de la calpastatine par.....	39
réaction de polymérase en chaîne (PCR).	
2.4 Amplification des régions 3'UTRs de la calpastatine par technique.....	40
de 3'RACE (3' Rapid Amplification of cDNA Ends)	
2.5 Sous-clonage et séquençage des produits de PCR.....	40
2.6 Détermination de la stabilité des ARNms de la calpastatine.....	42
2.7 Buvarpage northern (Northern Blot).....	42
2.8 Réaction de transcription <i>in vitro</i>.....	43
2.9 Préparation d'extrait de protéines totales de cellules HeLa.....	45

2.10 Préparation des différentes fractions de protéines purifiées de.....	45
cellules HeLa .	
2.11 Réaction de gel de retardement (gel shift).....	46
2.12 Préparation de membrane de protéines pour les expériences de.....	46
buvardage de type western et de type northwestern	
2.13 Essai de buvardage de type de northwestern.....	48
2.14 Expression de la protéine La recombinante.....	48
2.15 Buvardage de types western.....	49
 <u>3.0 RÉSULTATS.....</u>	 52
3.1 Amplification des différentes régions 3'UTRs de l'ARNm.....	52
de la calpastatine	
3.2 Les régions 3' non-codantes de la calpastatine d'autres espèces.....	57
3.3 Analyses structurales des régions 3'UTRs des ARNms de la.....	59
calpastatine humaine et d'autres espèces	
3.4 Diversité des ARNms de la calpastatine.....	63
3.5 Études de stabilité de l'ARNm de la calpastatine.....	66
3.6 Interactions de type ARN-protéine impliquant les régions.....	72
3'UTRs de la calpastatine.	
3.6.1 Interactions entre le 3'UTR II et des facteurs cytoplasmiques.....	75
3.6.2 Interactions entre le 3'UTR I (segment C) et les protéines	
CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.....	79
3.6.3 Interactions entre le segment A et les protéines CASTRBP84,	

CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.....	80
3.6.5 Interactions entre le segment B et les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.....	85
3.6.6 Présence des protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 dans d'autres lignées cellulaires et la spécificité de leurs interactions avec les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine.....	85
3.6.7 Localisation cellulaire des protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.....	88
3.7 Production de la protéine La recombinante par le.....	91
système pGEX4T-1	
3.8 Interaction de la protéine La avec les régions 3'UTRs de.....	97
l'ARNm de la calpastatine	
<u>4.0 DISCUSSION</u>.....	102
<u>5.0 CONCLUSION</u>.....	119
Références.....	122

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1	Structures de la grande et de la petite sous-unité de la superfamille des calpaïnes.	8
Figure 2	Structures de la calpastatine.	16
Figure 3	Formation et devenir d'une molécule d'ARNm dans une cellule de mammifère.	24
Figure 4	Régulation de la stabilité des ARNms.	31
Figure 5	Les différentes régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine.	54
Figure 6	Identification de deux nouvelles régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine	56
Figure 7	Analyse des structures secondaires des régions 3'UTRs des ARNms de la calpastatine humaine et d'autres espèces.	61
Figure 8	Diversité des transcrits de la calpastatine.	65
Figure 9	Stabilité des ARNms de la calpastatine en fonction des régions 3'UTRs qu'ils contiennent.	68
Figure 10	Stabilité des transcrits de la calpastatine déterminée par densitométrie.	71
Figure 11	Stratégie adoptée pour la synthèse des matrices d'ADN utilisées pour la transcription des différentes régions et segments 3'utrs de l'ARNm de la calpastatine.	74
Figure 12	Interactions de type ARN-protéine entre le 3'UTR II et des éléments <i>Trans</i> présents dans les extraits de cellules HeLa.	77
Figure 13	Interaction du 3'UTR I (segment C) avec les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.	82
Figure 14	Interaction du segment A des régions 3'UTR II, 3'UTR III et 3'UTR IV avec les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.	84

Figure 15 Interaction du segment B des régions 3'UTR III et 3'UTR IV avec les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.	87
Figure 16 Expériences de buvardage de type northwestern montrant la spécificité des interactions entre la région 3'UTR II et les protéines castrbp84, castrbp49, castrbp39 et castrbp26 et la présence de ces protéines dans d'autres lignées cellulaires	90
Figure 17 Localisation cellulaire des protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 déterminée par expérience de gel de retardement et par buvardage de type northwestern.	93
Figure 18 Expériences de buvardage de type northwestern et western blot.	96
Figure 19 Expression de la protéine La recombinante.	99
Figure 20 Interaction entre le 3'UTR II DE L'ARNm de la calpastatine et la protéine La.	101
Figure 21 Les signaux de polyadénylation présents sur les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine.	106

LISTES DES TABLEAUX

Tableau I : Séquences des oligonucléotides utilisés pour amplifier les différentes régions 3'UTR de l'ARNm de la calpastatine ainsi que le domaine 4 codant et une région de l'ARNm de la protéinase 3.....51

Tableau II : Pourcentage d'homologie entre les séquences codantes et non-codantes (différents segments des régions 3'UTRs) de l'ARNm de la calpastatine humaine et les séquences codantes et non-codantes de l'ARNm de la calpastatine d'autres espèces.....58

LISTES DES ABRÉVIATIONS

3'UTR :	Régions 3' non traduites
5'UTR :	Régions 5' non traduites
ActD :	Actinomycine D
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARE :	Éléments AU riche
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
AUBP :	protéine de liaison des éléments AU riche
BSA :	Albumine sérique bovine
CHX :	Cycloheximide
CLAP :	Chemostatin, Leupeptin, Antipain et Pepstatin
DTT :	Dithiothréitol
EC :	Enzyme commission
ECL :	Enhanced chemiluminescence
E.Coli :	Escherichia Coli
FR :	Facteur rhumatoïde
g :	gramme
IL :	Interleukine
Ig :	Immunoglobuline
IPTG :	Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
kDa :	kilo Dalton
l :	Litre
LED :	Lupus érythémateux disséminé
m :	milli
n :	nano
PABP :	protéine de liaison de la queue poly(A)
PBS :	Tampon phosphate/salin
PCR :	Réaction de polymérase en chaîne (Polymerase chain reaction)
PMSF :	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PR :	Polyarthrite rhumatoïde
SDS-PAGE :	Électrophorèse en gel polyacrylamide en condition dénaturante
μ :	micro

RÉSUMÉ

Le contrôle de l'expression des gènes eucaryotes peut avoir lieu à plusieurs niveaux : soit au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et au niveau post-traductionnel. La majorité des études se sont intéressées au niveau transcriptionnel de la régulation de l'expression des gènes. Cependant, de plus en plus d'observations montrent l'importance de la régulation post-transcriptionnelle. Cette dernière implique la régulation de la maturation du préARNm (épissage, ajout de coiffe méthylée et de queue poly(A)), le contrôle de la stabilité et de la traduction de l'ARNm ainsi que le contrôle de sa localisation cellulaire. Les régions 3'UTRs (3' non-traduite ou 3' Untranslated Regions) des ARNms participent de plusieurs façons différentes à la régulation post-transcriptionnelle des ARNms.

La calpastatine, une protéine de 120 kDa constituée de cinq domaines de 140 acides aminés chacun, représente l'inhibiteur spécifique et endogène de la protéase à cystéine, la calpaïne. L'ARNm de la calpastatine est représenté par plusieurs isoformes ubiquitaires ou histo-spécifiques. Des études effectuées chez plusieurs espèces animales ont montré que ces isoformes varient selon leurs compositions en séquences codantes. Aussi, nous avons pu montrer que les régions codantes de l'ARNm de la calpastatine ont le choix entre six régions 3'UTRs différentes, pour les accompagner dans leur périple dans le cytoplasme. Rares sont les transcrits eucaryotes possédant une telle diversité des régions 3'UTRs.

De plus, certaines séquences de ces régions 3'UTRs possèdent une grande homologie (jusqu'à 92 %) avec les régions 3'UTRs des ARNms de la calpastatine d'autres espèces

animales. Cette diversité des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine pourrait être le résultat d'un épissage alternatif ou un choix alternatif de signaux de polyadénylation.

Étant donné son implication dans la polyarthrite rhumatoïde, le système calpaïne-calpastatine (protéase-inhibiteur) est au centre de nos études au laboratoire depuis quelques années. En effet, la calpastatine constitue un autoantigène ciblé par le sérum des patients arthritiques. Des travaux précédents effectués dans notre laboratoire ont permis d'étudier l'incidence, la spécificité clinique et immunologique et l'éventuel rôle pathogénique des anticorps anti-calpastatine.

Les travaux présentés dans ce mémoire se sont plutôt concentrés sur l'étude des rôles éventuels des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine dans la régulation post-transcriptionnelle de ce dernier. Pour ce faire, nous avons étudié la stabilité des ARNms de la calpastatine possédants différentes régions 3'UTRs chez les cellules HeLa en utilisant l'actinomycine D (inhibiteur de la transcription). De plus, nous avons vérifié, par expériences de gel de retardement et buvardage de type northwestern, la présence d'éléments *Trans* (protéine de liaison de l'ARN), dans des lignées cellulaires humaines, impliqués dans des interaction de type ARN-protéine avec les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine.

Mes résultats suggèrent que : 1) les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine sont conservés chez différentes espèces animales montrant parfois des pourcentages d'homologies de 92 %, 2) des structures secondaires de type tige-boucle (stem-loop) sont conservées chez les ARNms de la calpastatine de différentes, 3) la stabilité de l'ARNm de la calpastatine n'est pas affectée grandement par le type de région 3'UTR qu'il contient, 4) nous avons pu identifier quatre protéines que nous avons nomée

CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 montrant des interactions de type ARN-protéine avec les régions 3'UTRs de la calpastatine, 5) les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 pourraient être les trois formes connues de la protéine La.

1.0 INTRODUCTION

La calpastatine, inhibiteur spécifique des calpaïnes (protéases à cystéine), est un autoantigène reconnue par le sérum de patients atteints de plusieurs maladies telles l'arthrite rhumatoïde, l'infertilité autoimmune et la sclérose systémique. De plus, le système calpaïne-calpastatine est impliqué dans plusieurs autres maladies telles l'Alzheimer, la cataracte, la thrombose et la dystrophie musculaire. Le système calpaïne-calpastatine joue un rôle important dans plusieurs processus physiologiques tel que le cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Ce système représente aussi un grand intérêt pour les groupes de recherche s'intéressant aux processus d'attendrissement de la viande des animaux comestibles. L'ARNm de la calpastatine est représenté par plusieurs isoformes. Deux de ces derniers sont exprimés de façon tissu-spécifique alors que d'autres le sont de façon ubiquiste. Ici, nous rapportons un autre aspect de la diversité des transcrits de la calpastatine qui implique leurs régions 3'UTRs. Nous nous sommes aussi intéressés au rôle éventuel de ces régions dans la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm de la calpastatine.

1.1 Le système calpaïne-calpastatine

1.1.1 Les calpaïnes

Les calpaïnes constituent une famille de cystéine-protéases cytosoliques dont certains membres sont exprimés de façon ubiquiste et d'autres façon histo-spécifique. Les calpaïnes sont actives à pH 7.0-7.5 et sont strictement dépendantes du calcium. Des

isoformes de la calpaïne ont été retrouvés dans chez les mammifères, les eucaryotes inférieurs tels que *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* et les champignons. Par ailleurs, aucun isoforme n'a été retrouvé chez les plantes, les bactéries et les levures (Carafoli et al., 1998). Les calpaïnes sont des protéines hétérodimériques constituées d'une sous-unité catalytique de 80 kDa et d'une sous-unité de 30 kDa, et dont la fonction n'est pas encore bien établie (Figure 1). La grande sous-unité est formée de quatre domaines (I à IV) tandis que la petite sous-unité est formée de deux domaines (V à VI). Le domaine I représente l'extrémité N-terminale de la sous-unité catalytique. Ce domaine contient le site d'auto-protéolyse de la grande sous-unité qui précède la protéolyse des substrats. Jusqu'à présent, sa fonction n'est pas encore très claire. Le domaine II contient le site actif représenté par les résidus Cys 105, His 262 et Asn 286. Le domaine III représente le lien entre le domaine catalytique et le domaine IV de liaison de Ca^{2+} . La fonction du domaine III n'est pas encore bien établie, mais des observations récentes suggèrent qu'il puisse avoir un rôle dans la transmission du signal d'activation due à la liaison du Ca^{2+} au domaine IV. On pense aussi que le domaine III pourrait contenir le site d'interaction avec l'inhibiteur spécifique et endogène des calpaïne, la calpastatine (Carafoli et al., 1998).

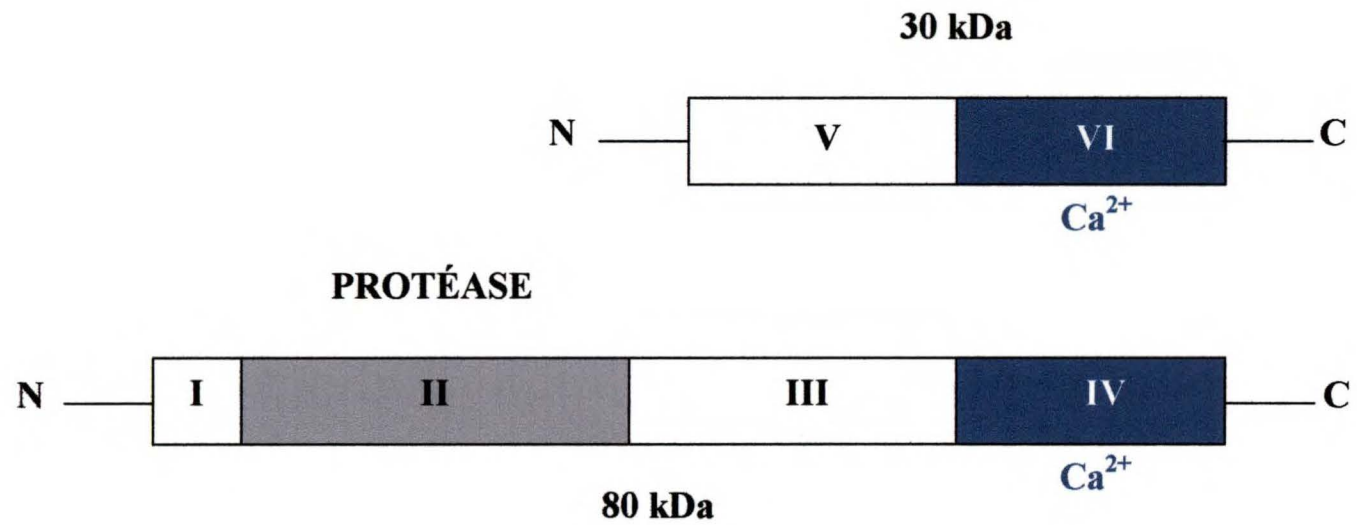
Le domaine IV présente une grande homologie de séquence avec la famille de protéines de liaison au calcium via les structures "EF-hand". Ce domaine contient cinq structures en boucle de liaison au calcium. De plus, une sixième structure en boucle, responsable de la liaison au calcium a été identifiée et localisée entre les domaines II et III.

**FIGURE 1 STRUCTURES DE LA GRANDE ET DE LA PETITE SOUS-
UNITE DE LA SUPERFAMILLE DES CALPAÏNES.**

La grande sous-unité de la calpaïne de 80 kDa se compose des quatre domaines (I-IV), tandis que la petite sous-unité de 30 kDa se compose de deux domaines (V et VI).

Domaine I : le domaine où l'autolyse s'effectue; domaine II : le domaine protéase homologue aux cystéines protéases; domaine III : le domaine de liaison à la calpastatine; domaines IV et VI : les domaines de liaison au Ca^{2+} ; domaine V : domaine de liaison à la membrane.

La Calpaïne



Le domaine V représente la région N-terminale, hydrophobe et riche en glycines de la petite sous-unité. Le caractère hydrophobe de ce domaine lui permet de jouer son rôle d'ancrage à la membrane, qui constitue la première étape d'activation des calpaïnes.

Le lien entre les domaines V et VI (de la petite sous-unité) est assuré par une séquence de polyproline. Le domaine VI de la petite sous-unité est homologue au domaine IV de la grande sous-unité, et contient quatre structures de liaison de Ca^{2+} "EF-hands" (Carafoli et al., 1998).

Des études récentes ont permis d'identifier plusieurs isoformes des calpaïnes, indiquant ainsi que ces enzymes constituent une large superfamille. Les membres de cette famille peuvent être classés parmi les calpaïnes typiques et les calpaïnes atypiques.

Les calpaïnes typiques regroupent les isoformes ubiquistes et les isoformes histo-spécifique. Il existe deux isoformes ubiquistes des calpaïnes, soit la μ -calpaïne et la m-calpaïne. Cette nomenclature est basée sur leur exigence en Ca^{2+} qui est de l'ordre du micromolaire pour la μ -calpaïne et d'ordre millimolaire pour la m-calpaïne. D'autres isoformes de la calpaïne sont exprimés de façon histo-spécifique. Parmi ces derniers, seul l'isoforme spécifique à l'estomac nCL-2 et l'isoforme spécifique au muscle squelettique p94 ont été étudiés de façon extensive.

Les calpaïnes atypiques regroupent des isoformes dont la structure primaire est différente. Ces isoformes possèdent un domaine protéase (domaine II), homologue à celui de la grande sous-unité de l'isoforme ubiquitaire sans toutefois contenir les autres domaines tel le domaine de liaison au Ca^{2+} (domaine IV) (Suzuki et al., 1998).

1.1.2 Les substrats des calpaïnes

Les deux isoformes ubiquiste des calpaïnes (μ et m calpaïnes) partagent la même spécificité pour les substrats. Les calpaïnes sont capables de cliver un large spectre de substrats cellulaires, parmi lesquels on retrouve :

- 1) Les proenzymes-kinases tels que la protéine kinase C (PKC) (Kishimoto et al., 1989), la calpastatine (Pontremoli et al., 1991) et la phospholipase C (Banno et al., 1995).
- 2) Les protéines du cytosquelette comme la spéctrine, la fodrine, l' α -actinine, la taline, la filamine (Croall et al., 1991, Ménard et El-Amine 1996), les protéines associées aux microtubules, la profilaggrine et la troponine dans les muscles (Carafoli E et al, 1998).
- 3) Les protéines membranaires; comme le clivage dans le domaine kinase de l'EGF (Gregoriou et al., 1994), le récepteur de l'inositol-(1,4,5)-triphosphate, le récepteur de la PDGF (Croall et al., 1991), la pompe Ca^{2+} -ATPase (James et al., 1989), et les molécules d'adhésions (intégrine, cadhérine et N-CAM) (Carafoli E et al, 1998).
- 4) Des facteurs de transcriptions comme la I- κ B (Lin et al., 1995), c-Jun, et c-Fos (Carillo et al., 1994), et récemment le suppresseur de tumeurs p53 (Kubbutat et al., 1997).
- 5) Les composants de la matrice extracellulaire (MEC), tel que les protéoglycans (Suzuki et al., 1992), la fibronectine (Sakai et al., 1996), la vitronectine (Seiffert 1996), l'arrestine dans la rétine (Azarian et al., 1995) et la myéline (MBP) (Tsubata et al., 1989).

1.1.3 Mécanisme d'activation des calpaïnes

Le mécanisme d'activation des calpaïnes dans l'environnement cellulaire et à des concentrations de Ca^{2+} physiologique est encore sujet de controverse. En effet, l'activité de la m-calpaïne dépend de concentrations millimolaires de Ca^{2+} , ce qui n'est pas représentatif des conditions physiologiques de la cellule. L'activation de cette calpaïne dans des cellules normales nécessiterait l'existence d'un mécanisme qui réduirait son exigence en Ca^{2+} . On pense qu'en présence d'ADN, les calpaïnes voient leur exigence en Ca^{2+} baissée à aussi peu que 3 μM , leur permettant ainsi de cliver des protéines nucléaires (Mellgren et al., 1993). Par ailleurs, l'association des calpaïnes aux phospholipides membranaires réduirait leur exigence en Ca^{2+} et stimulerait leur activité (Saido et al., 1992, Cottin et al., 1993). Récemment, on a démontré l'existence d'une protéine qui assure le rôle d'activateur des calpaïnes dans le cerveau du rat (Melloni et al., 1998). Cet activateur augmenterait l'efficacité d'autoprotéolyse de la calpaïne en abaissant son exigence pour le Ca^{2+} (Melloni et al., 1998).

Deux autres points concernant l'activation des calpaïnes restent encore sujets à controverse :

- 1) Jusqu'à récemment, seule la forme hétérodimérique des calpaïnes conventionnelles était supposée être active. Des observations récentes ont cependant démontré que la sous-unité catalytique de 80 kD peut cliver des substrats même en absence de la petite sous-unité (Vilei et al., 1997, Meyer et al., 1996).
- 2) L'autoprotéolyse des calpaïnes a été observée *in vitro* lorsque ces dernières sont exposées au Ca^{2+} . Les deux sous-unités sont alors clivées de leur cotés N-terminaux, induisant une augmentation de l'activité protéolytique de la calpaïne ainsi qu'une

baisse de l'exigence en Ca^{2+} (Imajoh et al., 1986). Par ailleurs, l'introduction de certaines mutations du côté N-terminal de la sous-unité catalytique empêche son autopréolyse, sans affecter sa capacité à cliver des substrats (Elce et al., 1997).

1.1.4 Fonctions des calpaïnes

Malgré le grand nombre des substrats de calpaïnes identifiés *in vitro*, seuls quelques-uns ont été confirmés par des expériences *in vivo*. Cette situation représente un obstacle quant à l'identification des fonctions physiologiques des calpaïnes. Par ailleurs, la majorité des rôles attribués aux calpaïnes a été démontrée en utilisant des inhibiteurs des calpaïnes. Certains de ces inhibiteurs, utilisés dans les premières études, n'étaient pas assez spécifiques. La calpastatine, seul inhibiteur spécifique aux calpaïnes, est incapable de traverser la membrane cellulaire et ne peut donc pas être utilisé dans des études *in vivo* conventionnelles. Plusieurs études ont permis d'associer l'activité des calpaïnes à certains processus physiologiques :

- 1) L'utilisation de certains inhibiteurs a permis de montrer la participation des calpaïnes dans le cycle cellulaire. La progression des fibroblastes vers la phase S est bloquée suite à l'utilisation des inhibiteurs ayant une plus grande affinité pour les calpaïnes que pour le protéasome (Zhang et al., 1997, Mellgren et al., 1997).
- 2) Les calpaïnes pourraient permettre l'augmentation de l'efficacité de transmission de signaux synaptiques. Il a été observé que l'augmentation du Ca^{2+} au niveau de l'épine synaptique, induite par une grande fréquence de stimulation (Musleh et al., 1997, Gellerman et al., 1997), est suivie par la protéolyse de deux substrats

préférentiels des calpaïnes; la protéine kinase C (PKC) et la spectrine (Del Cerro et al., 1994).

- 3) De plus en plus d'études montrent un rôle des calpaïnes dans l'apoptose. L'activation des calpaïnes durant l'apoptose a été montrée pour la première fois chez les thymocytes (Squier et al., 1994). De plus, divers inhibiteurs des calpaïnes bloquent l'apoptose chez plusieurs cellules immunitaires (Squier et al., 1994, Sarin et al., 1995). Par ailleurs, cette inhibition de l'apoptose par les calpaïnes semble être spécifique à certains systèmes. Par exemple, l'utilisation de l'inhibiteur des calpaïnes DI 50606 semble inhiber l'apoptose seulement chez certaines cellules telles les neurones et les neutrophiles (Nath et al., 1996, Vanags et al., 1996, Brown et al., 1997).

En plus de leur rôle dans les processus physiologiques normaux, les calpaïnes sont aussi associées à plusieurs pathologies :

- 1) Des études récentes ont montré que le niveau d'expression des calpaïnes est anormalement élevé dans les muscles de patients atteints de dystrophie musculaire. Ceci est probablement accompagné d'une augmentation de l'activité de ces protéinases puisqu'on a remarqué une augmentation de la quantité de la forme autolysée des calpaïnes (Spencer et al., 1995).
- 2) L'implication des calpaïnes dans le processus de formation de la cataracte a été suggérée à la suite de plusieurs observations. En effet, il a été rapporté que l'ARNm d'un isoforme majeur des calpaïnes augmente de façon considérable lors du processus de formation de la cataracte (Ma et al., 1997). Il a été observé que la

protéolyse des cristallins par les calpaïnes produit des polypeptides insolubles, responsables de l'opacification des lentilles (David et al., 1993).

- 3) L'implication des calpaïnes dans la physiopathologie de la maladie de l'Alzheimer a été proposée lorsqu'on a observé, par immunohistochimie sur des coupes de cerveaux de patients malades, un déséquilibre entre le niveau des calpaïnes intactes et le niveau des calpaïnes autolysées ainsi qu'une diminution de l'expression de l'inhibiteur spécifique des calpaïnes; la calpastatine (Saito et al., 1993).
- 4) Plusieurs études ont permis d'associer la suractivation des calpaïnes aux processus inflammatoires impliqués dans l'arthrite. En effet, une quantité de calpaïnes anormalement élevée est détectée dans le liquide synoviale, ainsi qu'au niveau des membranes synoviales des patients atteints d'arthrite (Yamamoto et al., 1992, Fukui et al., 1989, Yamamoto et al., 1994). Les synoviocytes de type B sécrètent des protéinases à cystéine lorsqu'elles sont stimulées avec du $\text{TNF-}\alpha$ et l'interleukine IL-1 (Huet et al., 1993). Finalement, les calpaïnes sont capables de dégrader les composantes de la matrice cartilagineuse de l'articulation, et cette dégradation peut être inhibée par la calpastatine (inhibiteur spécifique des calpaïnes) (Suzuki et al., 1992).
- 5) Les calpaïnes ont été associées à d'autres maladies telles que la thrombose (Schlosser et al., 1997) et l'infertilité (Wei et al., 1995).

1.1.5 L'inhibiteur endogène des calpaïnes : la calpastatine

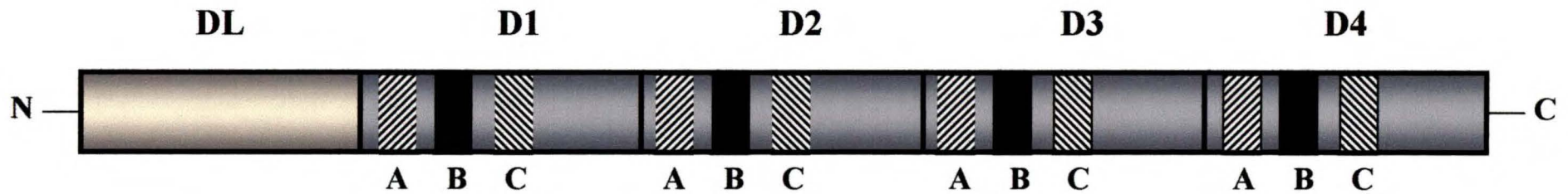
La calpastatine est l'inhibiteur spécifique et endogène des calpaïnes (Emori et al., 1987).

Cette activité d'inhibition n'affecte ni les autres protéinases à cystéine ni même

FIGURE 2 STRUCTURES DE LA CALPASTATINE

La calpastatine est une protéine ubiquitaire de 120 kDa, constituée de cinq domaines de 140 acides aminés chacun, un domaine N-terminal, DL de fonction inconnue et quatre autres domaines inhibiteurs, D1, D2, D3 et D4. La région conservée B contient la séquence inhibitrice (TIPPXYR), tandis que les régions A et C favorisent l'activité inhibitrice de la région B en augmentant la force de liaison de la molécule à la calpaïne.

La Calpastatine



120 kDa

l'isoforme p94 (histo-spécifique) des calpaïnes (Carafoli et al., 1998). La calpastatine est une protéine ubiquiste de 120 kD, constituée de cinq domaines de 140 acides aminés chacun, un domaine N-terminal (domaine L) de fonction inconnue et quatre autres domaines inhibiteurs (domaines 1 à 4) (Figure 2). Ces quatre domaines inhibiteurs, 1, 2, 3, et 4 sont très homologues entre eux, et possèdent une séquence consensus d'inhibition LGXK(R)D(E)XTIPPXYRXLL (Kawazaki et al., 1996). Cette séquence est organisée en trois régions conservées, A, B et C. La région conservée B (TIPPXYR) est essentielle pour l'activité d'inhibition Ca^{2+} -dépendante des calpaïnes par la calpastatine (Maki et al., 1988, Kawazaki et al., 1989), tandis que les régions A et C favorisent l'activité inhibitrice de la région B en augmentant la force de liaison de la molécule à la calpaïne. En effet, les régions conservées A et C interagissent avec les domaines IV et VI de la calpaïne, respectivement, tandis que la région conservée B couvre le site catalytique du domaine II (Ma et al., 1994). La calpastatine serait par la suite, clivée par les calpaïnes dans ces régions conservées, donnant ainsi des petits fragments tous potentiellement inhibiteurs. L'utilisation des domaines inhibiteurs 1 à 4 recombinants a permis de montrer que le potentiel inhibiteur de ces domaines est variable : $1 > 4 > 3 > 2$.

Le système calpaïne-calpastatine est le plus étudié des systèmes protéolytiques cytoplasmiques. Des études utilisant des méthodes biochimiques ont montré que la calpaïne et la calpastatine sont sécrétées dans le milieu extracellulaire, par un mécanisme inconnu étant donné qu'elles ne possèdent pas de "séquence signal". De plus, on a observé la présence des calpaïnes μ et m , et de la calpastatine dans le liquide synovial chez des donneurs sains et arthritiques, néanmoins avec une quantité beaucoup plus élevée chez ces derniers (Fukui et al., 1989).

1.1.6 L'autoimmunité et la calpastatine

Plusieurs études ont montré que la calpastatine est une cible auto-antigénique préférentielle des auto-anticorps produits par des patients atteints de différentes maladies autoimmunes :

- 1) Une étude des causes d'infertilité autoimmune a montré, que la BS-17, une protéine de 17kDa présente dans l'extrait protéique du sperme réagit avec le sérum d'une femme infertile (Wei et al., 1994). On a pu montrer par la suite, à l'aide d'un criblage d'une bibliothèque d'ADNc de testicule humain par l'anticorps polyclonal anti-BS-17, que la BS-17 était la calpastatine (Wang et al., 1994). Des expériences *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'utilisation des anticorps monoclonaux contre cette protéine empêchent la fertilisation de l'ovule par le sperme (Wei et al., 1994). D'autres études ont pu montrer que les auto-anticorps produits par les patients atteints d'infertilité autoimmune reconnaissent l'isoforme de la calpastatine spécifique au testicule humain dont la structure sera discutée plus bas (Liang et al., 1994).
- 2) La calpastatine a été identifiée comme un autoantigène humain après un immunocriblage d'une bibliothèque d'ADNc de placenta humain par des sérums arthritiques qui sont positifs (Després et al., 1995). Des études récentes menées dans notre laboratoire nous ont permis de montrer que 83% de patients PR possèdent des anticorps anti-calpastatine et que les IgGs purifiés bloquent l'inhibition de la m-calpaïne par la calpastatine (El-Amine et al, en préparation). Ceci suggère que la suractivation et la surexpression des calpaïnes chez les patients atteints par la PR sont dues au blocage de la calpastatine par les IgGs et

donc au relâchement de l'activité protéolytique des calpaines dans la matrice extracellulaire.

- 3) Des auto-anticorps dirigés contre la calpastatine ont été identifiés dans le sérum de 38 % des patients atteints de sclérose systémique. De plus, la présence des IgGs anti-calpastatine est fortement associée au haut niveau de sédimentation des érythrocytes. Ceci suggère que les anti-calpastatines seraient impliqués dans les processus inflammatoires observés chez les patients atteints de sclérose systémique (Sato et al., 1998).

1.1.7 Diversité structurale de la calpastatine

Beaucoup d'études ont montré que la calpastatine subit une régulation post-transcriptionnelle au niveau de l'épissage, donnant lieu à une multitude de transcrits. En effet, la calpastatine érythrocytaire et la calpastatine testiculaire ne possèdent que les trois domaines inhibiteurs 2, 3 et 4, et il leur manque donc les domaines L et 1. L'isoforme testiculaire possède en plus une nouvelle région de 65 acides aminés située avant le domaine 2.

Le séquençage de la région de l'ADN génomique correspondant à ces deux domaines a permis de montrer que cette région de la calpastatine subit une modulation par épissage alternatif de type "exon-skipping" (Lee et al., 1992). Par ailleurs, des études récentes montrent qu'il existe, au niveau du cerveau du rat, quatre isoformes différents de l'ARNm de la calpastatine. Cette diversité de transcrits pourrait affecter la susceptibilité de la calpastatine à subir des modifications post-traductionnelles (De Tello et al., 1998). Étonnamment, l'un de ces quatre transcrits n'est composé que du domaine L et 1, alors

qu'un autre transcrit n'est composé que du domaine L et ne possède donc aucune activité inhibitrice (De Tellio et al, 1998).

Le promoteur de la calpastatine bovine a été cloné à partir de l'ARNm d'une bibliothèque génomique. L'analyse des séquences clonées a démontré l'existence d'une nouvelle région N -terminale avec un nouveau site d'initiation, codant pour un nouveau domaine appelé XL de 68 a.a. La région promotrice clonée a montré une activité transcriptionnelle augmentée par l'AMPc dibutyryl, qui est un activateur de la protéine kinase A (PKA) (Cong et al., 1997). La séquence d'acides aminés du domaine XL flanquant les sites potentiels de phosphorylation par la PKA sont conservés dans les transcrits de la calpastatine de la souris, de l'humain et bovin (Takano et al., 1999). Ceci renforce les résultats antérieurs qui montraient l'implication de la PKA dans la phosphorylation de la calpastatine. De plus, la forme phosphorylée de la calpastatine inhibe moins bien la μ -calpaïne que la m-calpaïne, tandis que la forme non-phosphorylée inhibe mieux la μ -calpaïne que la m-calpaïne (Mellgren et al., 1991 et Salamino et al., 1994). L'activité de la PKA pourrait donc moduler l'efficacité, et la spécificité de la calpastatine.

La diversité des isoformes de l'ARNm de la calpastatine est augmentée par la variabilité des séquences constituant les régions 3'UTRs (3' non-traduite ou 3' Untranslated Region) de ces transcrits. En effet, le criblage d'une bibliothèque d'ADNc de placenta humain nous a permis d'isoler deux clones d'ADNc de la calpastatine, RA1.2 et RA1.6, dont les région 3'UTR présentent des organisations différentes. Ces deux régions 3'UTRs sont homologues à 100% dans 273 nucléotides situés après le codon Stop (TAA), et le reste des séquences sont uniques et non-homologues (Figure 5, B) (El-Amine et al., en préparation). Les séquences des deux nouveaux clones, RA1.2 et RA1.6, ont été publiées

dans la banque des données GenBank et leur numéro d'accèsion respectif est U31346 pour RA1.2 et U31345 pour RA1.6.

À partir de ces résultats, nous avons comparé nos séquences des 3'UTRs avec celles publiées dans la banque de données GenBank : celles de la calpastatine des cellules HeLa (Numéro d'Accèsion D50827 et Mimori et al., 1995), et celles de l'isoforme spécifique au testicule humain, (Numéro d'Accèsion U58996 et P.A.O'Hern et al., 1996). Ces deux derniers ADNc de la calpastatine possèdent chacun un 3'UTR différent de ceux que nous avons caractérisé. En effet, les 273 nucléotides situés après le codon stop (TAA) présentent une homologie de 100% avec les 273 premier nucléotides des régions 3'UTRs des nouveaux clones, RA1.2 et RA1.6 de la calpastatine. Les séquences qui suivent cette région de 273 nucléotides ne sont pas homologues aux régions 3'UTRs que nous avons isolées.

L'épissage alternatif et/ou un choix alternatif des sites de polyadénylation pourraient être responsable de la création d'une telle diversité des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine (Edwards-Gilbert et al., 1997, Ichiyoshi et al., 1987). De plus, nous avons vérifié la distribution tissulaire des deux régions 3'UTRs des clones RA1.2 et RA1.6 par technique de buvardage Northern en utilisant l'ARNm provenant de différents tissus humains. Ainsi, nous avons pu estimé que les messagers possédant la région 3'UTR RA1.6 sont plus abondants que les messagers possédant la région 3'UTR RA 1.2.

Plusieurs études ont montré que les régions 3'UTRs affectent la fonction des ARNms au niveau du cytoplasme par différents mécanismes dont, leur localisation cytoplasmique, le contrôle de leur stabilité, l'efficacité de leur traduction (Decker et al., 1995).

1.2 La région 3'UTR

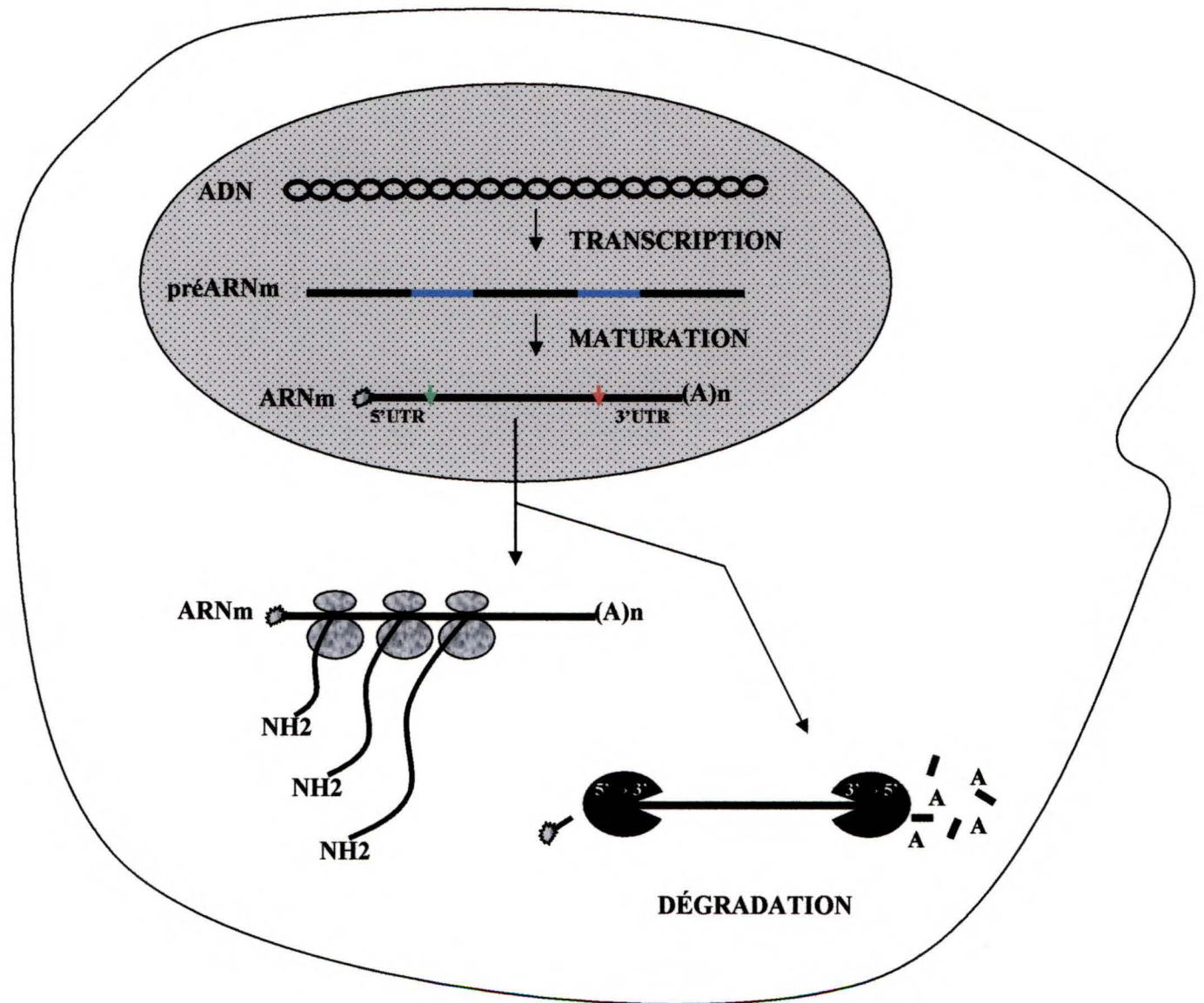
Le contrôle de l'expression des gènes eucaryotes peut avoir lieu à trois niveaux (Figure 3):

- 1) La régulation transcriptionnelle qui dépend des signaux d'activation ou de répression de la transcription et des types de promoteurs.
- 2) La régulation post-transcriptionnelle incluant, l'épissage de l'ARNm, sa stabilité, sa localisation et sa traduction.
- 3) La régulation post-traductionnelle s'effectuant par le contrôle de la stabilité et des modifications biochimiques des protéines synthétisées.

La majorité des études de l'expression des gènes a été concentrée sur la compréhension des processus impliqués dans la régulation transcriptionnelle. Cependant, l'importance des mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle dans le contrôle de l'expression de plusieurs gènes devient de plus en plus claire. Certains de ces mécanismes ont été très bien identifiés et caractérisés pour certains gènes. Tous les processus impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle reposent sur des interactions spécifiques de type ARN-protéine entre des éléments *Cis* (éléments intrinsèques à l'ARNm tels que des séquences spécifiques ou des structures particulières) et des facteurs *Trans* (éléments extrinsèques tels que des protéines de liaison de l'ARN). Ces interactions contrôlent la dégradation des ARNms, leur stabilisation, l'accès des ribosomes au codon d'initiation de la traduction, ou la localisation des ARNms (Decker et al., 1995).

FIGURE 3 FORMATION ET DEVENIR D'UNE MOLÉCULE D'ARNm DANS UNE CELLULE DE MAMMIFÈRE

L'ARN est synthétisé d'une portion d'ADN génomique qui représente un gène. Le préARNm subit alors des modifications biochimiques nucléaires telles que, l'addition de la coiffe, la polyadénylation et l'épissage donnant naissance à une molécule d'ARNm mature qui sera transportée du noyau vers le cytoplasme où a lieu sa traduction par les ribosomes, ou sa dégradation par les ribonucléases. Chaque étape représente, pour la cellule, un moyen pour le contrôle du niveau d'un ARNm. (▼) représente le codon d'initiation et (▼) représente le codon stop.



De telles interactions peuvent avoir lieu au niveau des régions non-traduites 5'UTRs et 3'UTRs ou au niveau des régions traduites de l'ARNm.

1.2.1 Les 3'UTRs et stabilité des ARNms

Le taux de synthèse d'une protéine dépend généralement de la concentration de son ARNm disponible pour la traduction. Par ailleurs, cette concentration dépend elle-même du taux de synthèse de l'ARNm d'une part et de son taux de dégradation d'autre part. Le taux de dégradation de l'ARNm dépend de sa demie-vie, qui varie de quelques minutes pour certains à plusieurs jours pour d'autres (Day et al., 1998). Par conséquent, tout facteur ou mécanisme capable de moduler la stabilité d'un ARNm affectera le taux de synthèse de la protéine encodée par ce dernier.

Une grande majorité des ARNms eucaryotes contiennent, dans leurs extrémités 5', une coiffe (5') 7-méthylguanosine dont le rôle est de protéger l'ARNm de la dégradation par les exonucléases 5'→3'. Aussi, ils contiennent, dans leurs extrémités 3', une queue poly(A) pouvant atteindre une longueur de 200 adénosines. Le rôle de cette dernière consiste à protéger l'ARNm de la dégradation par les exonucléases 3'→5'. De plus, plusieurs séquences spécifiques, localisées dans les régions 5'UTRs, les régions traduites ou les régions 3'UTRs, peuvent affecter la stabilité des ARNms.

Pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la stabilité des ARNms eucaryotes, il serait donc important de comprendre, avant tout, les mécanismes mis au point par la cellule pour procéder à leur dégradation.

1.2.1.1 Mécanisme de dégradation dépendant de la queue Poly(A)

Un des mécanismes majeurs de la dégradation des ARNm est dépendant de la queue Poly(A) et, par ce fait, est initié par le raccourcissement de la queue poly(A). Ceci résulte alors dans la perte de la coiffe méthylée et, subséquemment, dans la dégradation par des exonucléases 5'→3', de l'ARNm (Ross et al., 1996). Dans une autre variante de ce processus, une dégradation de l'ARNm par des exonucléases 3'→5' a été observée, suite au raccourcissement de la queue poly(A) (Day et al., 1998). Plusieurs séquences, favorisant le raccourcissement de la queue poly(A), ont été identifiées : des séquences contenant des éléments riche en AU (Adénosine –Uridine-riche, ARE), ont été localisées dans la région traduite de l'ARNm de *c-fos* et dans sa région 3'UTR (Chen et al, 1994). Chez la levure, des séquences semblables ont été identifiées dans la région 3'UTR de l'ARNm de MFA2 (Muhlrad & Parker, 1992). Par ailleurs, des études récentes ont montré que la queue poly(A) n'assure pas directement la stabilisation de l'ARNm. En effet, le groupe de Jeffrey (Jeffrey et al., 1998) a pu montrer que la queue poly(A) ne sert au fait qu'à assurer la liaison de la protéine PABP (poly(A) binding protein) à l'extrémité 3'UTR. Ainsi, c'est la protéine PABP qui a comme fonction de protéger l'ARNm de l'action des exonucléases.

1.2.1.2 Les éléments "AU-riche" (ARE)

Chez les mammifères, les régions 3'UTRs de plusieurs ARNm instables contiennent des éléments riches en adénosine et uridine (ARE). Plusieurs, de ces éléments riche en AU (ARE) sont organisés en deux domaines (Ross et al., 1996) : le domaine I, constitué de 40-50 nucléotides, contient l'élément riche en AU formé de plusieurs pentamères

"AUUUA". Le domaine II, adjacent au domaine I, consiste en une région riche en Uridine de 20 nucléotides. Deux observations importantes ont permis de relier les éléments riche en AU (ARE) à l'instabilité de plusieurs ARNm :

- 1) Les ARNm contenant des éléments riche en AU tendent à être plus instables que ceux qui n'en possèdent pas.
- 2) Lorsque les éléments riche en AU provenant des régions 3'UTRs d'ARNms instables, tel que l'ARNm du GM-CFS ('granulocyte-macrophage-colony stimulating factor'), sont transférés dans les régions 3'UTRs d'un ARNm stable, tel que l'ARNm de la β -globine, ce dernier perd alors sa grande stabilité, et se dégrade beaucoup plus rapidement dans la cellule (Shaw et al., 1986).

Plusieurs études, s'intéressant au rôle des éléments riche en AU dans la stabilité des ARNm, ont permis d'identifier une famille de protéines AUBPs (protéines liant les éléments riche en AU, ARE-binding proteins) qui jouent un rôle dans la déstabilisation des ARNm en interagissant avec les éléments riche en AU présents dans leurs régions 3'UTRs (figure 4 A) (Ross et al., 1996).

La protéine AUF1, faisant parti de la famille des protéines hnRNP D, joue un rôle dans la régulation de la stabilité de plusieurs ARNm tel que l'ARNm de GM-CFS (Cairo et al, 1996) via son interaction avec les éléments riches en AU présents dans sa région 3'UTR.

1.2.1.3 Mécanismes de dégradation poly(A)-indépendants

Dans certains cas, la cellule peut procéder à la dégradation de certains ARNm par un mécanisme poly(A)-indépendant. L'ARNm perd alors la coiffe méthylée, sans l'influence de la queue poly(A), ni celle de la PABP. Ceci permet alors aux exonucléases 5'→3' de

procéder à la dégradation de l'ARNm. Un exemple de ce mécanisme a été observé chez la levure lors d'études sur la dégradation de l'ARNm de *PGK1*, chez lequel on a introduit par mutagenèse dirigée un codon stop au début de la région traduite (Muhlrad & Parker, 1994). L'arrêt prématuré de la traduction de cet ARNm modifié induisait une baisse importante de sa demi-vie (Day et al., 1998, Peltz et al., 1993). Cette augmentation de la vitesse de dégradation de l'ARNm *PGK1* modifié dépendait de l'interaction de ce dernier avec des protéines codées par les gènes UPF (Day et al., 1998). Un mécanisme semblable a été observé chez des cellules de mammifères, et semble être responsable de la dégradation des ARNms contenant encore des introns qui réussissent à quitter le noyau après un épissage anormal (Day et al., 1998). Ainsi, les cellules eucaryotes semblent avoir développé ce mécanisme pour dégrader les ARNms aberrants qui ne peuvent pas être traduits.

1.2.1.4 Dégradation des ARNms par les endonuléases.

Plusieurs ARNms eucaryotes sont dégradés via un clivage endonucléotique précédant la déadénylation de la queue poly(A). En effet, des sites de clivage par des endonuléases ont été identifiés dans les régions traduites ainsi que dans les régions 3'UTRs de plusieurs ARNms incluant l'ARNm du proto-oncogène *c-myc* (Bernstein et al., 1992), l'ARNm de l'albumine de *Xenopus laevis* (Dompenciel et al., 1995) et l'ARNm du récepteur de la transferrine (Binder et al., 1994).

La demi-vie de plusieurs ARNms est modulée en réponse à plusieurs facteurs dont, le niveau des nutriments, le taux de croissance cellulaire, les infections virales, l'exposition à des toxines et carcinogènes et aux changements de température. On croit que les

cellules de mammifères contiennent un très faible nombre de ribonucléases. Ces ribonucléases n'ont pas la caractéristique de restriction tel que les endonucléases de restriction spécifiques à l'ADN, et sont donc capables de dégrader, de façon non-spécifique, la majorité des ARNms présents dans les cellules. Cependant, certains ARNms semblent être plus sensibles que d'autres à l'action de ces ribonucléases. Ceci peut être dû aux différences dans leurs structures primaires et à d'autres facteurs incluant les affinités qu'ils possèdent pour les différentes protéines qui lient les ARNms pour les stabiliser ou les déstabiliser.

Les protéines PABP (poly(A)-binding protein) et AUBPs (ARE-binding proteins) possèdent la particularité d'interagir avec plusieurs ARNms différents. Leurs fonctions de stabilisation (ou de déstabilisation) répondraient donc à des mécanismes de régulation semblables. Cependant, il existe d'autres protéines qui ont la particularité d'interagir avec un seul ou un faible nombre d'ARNms. Un exemple de ce type d'interaction a été observé chez l'ARNm du récepteur de la transferrine (*TfR*). Cinq éléments IREs (éléments de réponse à la concentration en fer, iron responsive elements) sont localisés dans la région 3'UTR de l'ARNm de *TfR* (Figure 4 B). Un site de clivage endonucléotique est situé entre chaque élément IRE. Le clivage de l'ARNm de *TfR*, au niveau de ces sites est contrôlé par des protéines qui interagissent avec les IRE : les protéines IREBPs ("IRE binding protein"). En effet, en réponse à une baisse de la concentration de fer intracellulaire, les protéines IREBPs voient leur affinité pour les éléments IREs augmenter (Figure 4, B). L'interaction qui s'en suit va empêcher l'accès des nucléases aux sites de clivages situés entre les éléments IREs. Ceci résulterait alors en

FIGURE 4 RÉGULATION DE LA STABILITÉ DES ARNms

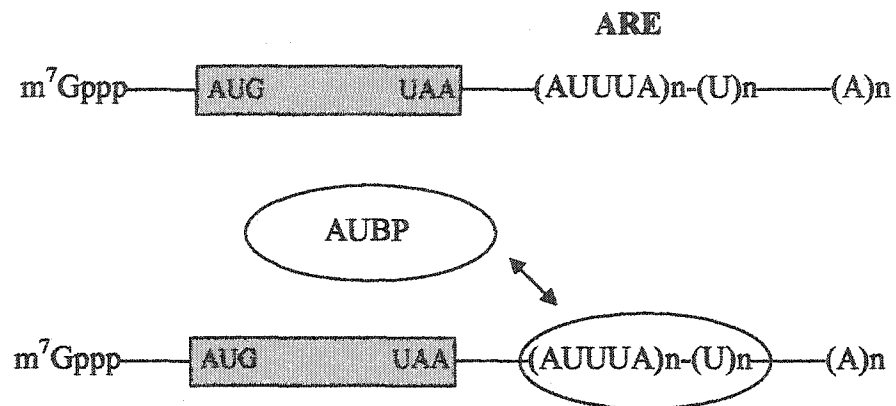
Les protéines de liaison de l'ARN qui régulent la stabilité des ARNms.

(A) Chez les mammifères un grand nombre des ARNms instables contiennent des éléments AREs dans leurs régions 3'UTRs qui pourrait être liés par les protéines AUBPs dans le but de promouvoir le raccourcissement de la queue poly(A).

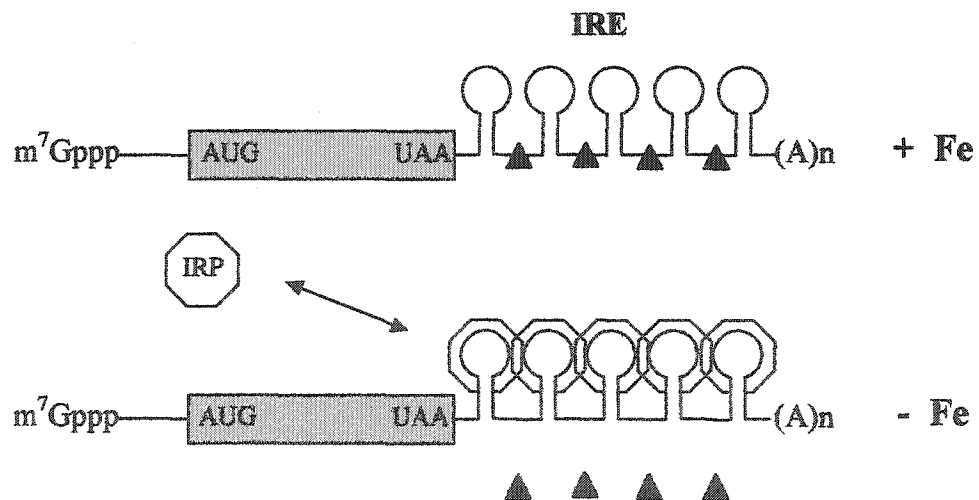
(B) l'ARNm du récepteur de la transferrine (*TfR*) contient cinq éléments IRE (iron responsive elements) et des sites de clivages endonucléotiques (▲). En réponse à une baisse de la concentration de fer intracellulaire, les protéines IREBPs ("IRE binding protein") voient leur affinité pour les éléments IREs augmenter. L'interaction qui s'en suit va prévenir l'accès des nucléases aux sites de clivages qui se situe entre les éléments IREs et rend donc l'ARNm *TfR* plus stable.

Régulation de la stabilité des ARNms

A



B



une forte augmentation de la concentration de l'ARNm de *TfR*, qui entraînerait à son tour une augmentation de la quantité du récepteur transferrine synthétisé. La concentration optimale de fer intracellulaire pourrait alors être rétablie. Par contre, lorsque la concentration de fer intracellulaire est trop élevée, l'interaction IRE-IREBP s'affaiblit, libérant ainsi les sites de clivages endonucléotiques, ce qui entraînerait une augmentation du taux de dégradation de l'ARNm *TfR* (Day et al., 1998).

Par ailleurs, d'autres protéines ont la particularité de lier plusieurs ARNm différents. Un exemple intéressant de cette classe de protéine consiste en la protéine La. En effet, plusieurs études ont montré que la protéine La lierait les éléments poly(U)-riche des transcrits de l'ARN polymérase III (les précurseurs des ARNt et les ARN 5S) ainsi que d'autres ARNs cellulaires et viraux (Heise et al., 1999). Les fonctions attribuées à la protéine La sont presque aussi nombreux que les ARNs qu'elle lie. Ainsi, la protéine La semble être nécessaire à la maturation des ARNt (Heise et al., 1999), à l'activation de la traduction des ARNms du poliovirus et du virus de l'hépatite C (Heise et al., 1999) et à la stabilisation de l'ARNm de l'histone (Heise et al., 1999). De plus, la protéine La semble avoir une activité hélicase. Il a été démontré que la capacité de la protéine La à lier plusieurs ARNs dépendrait de son état de phosphorylation.

En résumé, la stabilité d'un ARNm donné pourrait être contrôlé par : (1) des séquences spécifiques intrinsèques (éléments *Cis*), situés dans les régions traduites ou dans les régions non traduites 3'UTRs et 5'UTRs, (2) par des protéines de liaison de l'ARN qui lierait plusieurs ARNms ou un seul ARNm spécifiquement. Aussi, la demi-vie de plusieurs ARNms peut être modulée en réponse à plusieurs facteurs, tels que les stimulus

de l'environnement, le niveau des nutriments, les cytokines, les hormones, les changements de température et les infections virales.

1.2.2 Les 3'UTRs et le contrôle de la traduction.

Il existe plusieurs exemples d'ARNms où la région 3'UTR assure une fonction de régulation spatiale ou temporelle de la traduction. Ce type de mécanisme de régulation post-transcriptionnelle est particulièrement commun durant le développement précoce, durant lequel la transcription est absente (Decker et al., 1995). Dans plusieurs cas, la région 3'UTR semble contenir des séquences spécifiques de régulation négative qui interagissent avec des facteurs *Trans* pour inhiber la traduction. De telles séquences ont été identifiées chez un bon nombre d'ARNm tel que l'ARNm de *fem3* chez *Caenorhabditis elegans* (Decker et al., 1995) et les ARNm du "hunchback" et "bicoid" chez la drosophile. Ces éléments négatifs peuvent induire la répression de la traduction par deux mécanismes possibles :

- 1) Il est bien connu que la queue poly(A) est nécessaire pour la traduction des ARNms. Ces éléments négatifs peuvent inhiber la traduction en stimulant le raccourcissement et la perte de la queue poly(A). Ceci peut être supporté par l'observation chez certains ARNm, tel que l'ARNm de *fem3*, que la répression de la traduction coïncidait avec le raccourcissement de la queue poly(A) (Decker et al., 1995).
- 2) Pour d'autres ARNms, tels que l'ARNm de l'interféron β et l'ARNm de la lipoxgénase, des éléments de régulation négative sont présents au niveau de leurs régions 3'UTRs, et induisent ainsi une répression de la traduction par un mécanisme poly(A)-indépendant. Ceci a été rapporté par Decker et al., 1995, qui ont montré, *in*

vitro, que des 3'UTRs qui contiennent des éléments de régulation négative peuvent induire la répression de la traduction d'ARNms dépourvues d'une queue poly(A).

Plusieurs études ont montré que les régions 3'UTRs de plusieurs ARNms peuvent renfermer des éléments de régulation positive de la traduction. Ainsi, ces éléments peuvent stimuler la traduction en interférant avec les éléments de régulation négative présents eux aussi au niveau de la même région 3'UTRs ou, simplement, en stimulant la traduction de façon directe (Decker et al., 1995).

On a observé chez plusieurs animaux, que durant la maturation des ovocytes et l'embryogenèse, il y a une levée de la répression de la traduction des ARNm de provenance maternelle, activant ainsi leur traduction (Decker et al., 1995). Dans certains cas, cette régulation positive a lieu selon un mécanisme poly(A)-indépendant. Mais chez un grand nombre d'ARNms, cette régulation positive de la traduction requiert l'implication des séquences présentes au niveau de la région 3'UTR qui induisent la polyadénylation de l'ARNm, permettant ainsi sa traduction (Decker et al., 1995).

1.2.3 Les 3'UTRs et la localisation des ARNms

La localisation spécifique des ARNms dans différentes régions du cytoplasme peut jouer un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle des transcrits. Des séquences 3'UTRs de plusieurs ARNms ont été décrites comme étant capable d'assurer la localisation spécifique de ces derniers (Decker et al., 1995). En effet, les 3'UTRs d'ARNms ayant une distribution cytoplasmique asymétrique sont nécessaires et suffisants pour leur propre localisation. Cette distribution localisée de l'ARNm, résulte en une localisation de l'expression de la protéine qu'il encode. Ceci peut être des fois important

pour l'établissement d'un gradient morphologique et/ou pour l'assemblage de complexes macromoléculaires spécifiques à des sites cytoplasmiques particuliers. Le processus de localisation des ARNm comprend deux phases importantes : une phase de transport et une phase d'ancrage. La tubuline est importante pour le transport de l'ARNm de Vg1 vers le pôle végétal de l'ovocyte de *Xenopus*, alors que l'actine assure son ancrage au site où il a été localisé (Decker et al., 1995). Les composantes du cytosquelette, impliquées dans les différentes phases de localisation de l'ARNm, diffèrent d'un type cellulaire à un autre (Decker et al., 1995).

Le cytosquelette est composé de trois systèmes de filaments majeurs : les microtubules, les filaments intermédiaires et les microfilaments (ou filaments d'actine). Les études initiales, basées sur l'utilisation d'expériences de fractionnement biochimiques et des analyses *in situ*, ont permis de suggérer que plusieurs ARNm sont associés aux composantes du cytosquelette. Les rôles des microfilaments (ou les filaments d'actine) et celui des microtubules dans le transport et la localisation des ARNm ont été bien décrits alors que ceux des filaments intermédiaires restent encore à clarifier. Le rôle des 3'UTRs dans la localisation des ARNm dépend généralement des protéines qui lient l'ARNm au niveau de certaines séquences spécifiques localisées dans ces régions 3'UTRs. En effet, une protéine Vg1 RBP (Vg1 RNA binding protein) reconnaît et lie une séquence spécifique dans la région 3'UTR de l'ARNm Vg1 d'une part, et lie les microtubules d'autre part (Jansen et al., 1999). Dans ce cas, le rôle de la région 3'UTR dans le transport et l'ancrage de l'ARNm n'est pas direct, mais dépend plutôt de l'action intermédiaire d'une protéine capable de lier l'ARNm et les composantes du cytosquelette.

1.2.4 Interactions entre les extrémités 5' et 3' des ARNm

En raison des observations qui montraient que les régions 3'UTRs peuvent influencer et réguler des événements qui ont lieu au niveau de l'extrémité 5', tels que l'initiation de la traduction et le clivage de la coiffe méthylée, il a été suggéré que les extrémités 5' et 3' des ARNms pourraient interagir ensemble sous forme d'une structure de ribonucléoprotéine appelé mRNP (messenger ribonucleoprotein). Une telle interaction a été proposé auparavant pour expliquer comment la queue poly(A) pouvait stimuler la traduction (Decker et al., 1995) et protéger la coiffe méthylée du clivage (Decker et al., 1995). L'observation de polysomes circulaires par microscopie électronique, dans plusieurs types cellulaires, suggère que l'extrémité 5' et l'extrémité 3' des ARNms seraient dans une proximité physique l'un de l'autre (Decker et al., 1995) (Figure 5).

plus récemment, le groupe de Sachs (Wells et al., 1998) a montré que l'interaction entre la coiffe méthylée et la queue poly(A) résulte en l'activation de la traduction chez la levure. Ainsi, il a montré que cet effet est due à l'interaction des protéines de liaison de la coiffe méthylée et de la queue poly(A) (eIF4E et Pab1p respectivement) avec le facteur de traduction eIF4G. De plus, il a montré que le complexe eIF4E/eIF4G/Pab1p, reconstitué par des protéines recombinantes, est capable de circulariser des ARN qui possèdent une coiffe méthylée et une queue poly(A). Une interaction directe entre la région 3'UTR et la région 5'UTR pourrait avoir comme rôle, le recyclage des facteurs de traduction. Une possibilité alternative serait que l'interaction entre l'extrémité 5' et l'extrémité 3' est indirecte et qu'elle résulterait de l'association de la région 3'UTR avec le cytosquelette. Cette association peut promouvoir la traduction en amenant l'extrémité 5' de l'ARNm à proximité des facteurs de traduction qui sont associés au cytosquelette. Ceci aurait comme conséquence aussi de protéger la coiffe méthylée du clivage.

1.3 Hypothèses de travail

La diversité des régions 3'UTRs de la calpastatine suggère une régulation post-transcriptionnelle différentielle des ARNm de la calpastatine, qui pourrait affecter leur stabilité, leur traduction ou leur localisation. Ces différents aspects de la régulation post-transcriptionnelle dépendent souvent des interactions de types ARN-protéine entre les régions 3'UTRs et des protéines de liaison de l'ARN.

Les objectifs de mon projet de maîtrise sont de :

- 1- Vérifier l'étendue de la diversité et de l'organisation des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine.
- 2- Étudier la conservation de ces régions 3'UTRs chez différentes espèces animales.
- 3- Analyser les structures secondaires des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine de l'humain et des autres espèces dans le but d'identifier des éléments *Cis* qui pourraient avoir un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de ces ARNm.
- 4- Déterminer la stabilité des ARNm de la calpastatine et vérifier si elle est influencée par leurs différentes régions 3'UTRs.
- 5- Vérifier la présence, dans des extraits de cellules humaines, de facteurs *Trans* (protéines de liaison de l'ARN) qui pourraient montrer des interactions avec les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine.
- 6- Et finalement, si il y a interaction, vérifier si des protéines déjà décrites dans la littérature pourraient correspondre à celles qui seraient impliquées dans l'interaction avec les 3'UTRs de la calpastatine.

2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Extraction de l'ARN total.

Des cellules humaines d'ostéoblastes en culture, des cellules HeLa et du tissu placentaire ont été utilisés pour l'extraction de l'ARN total. 1 ml de Trizol (Gibco BRL, Life technologies, NY, USA) a été ajouté aux cellules, suivie d'une incubation de 5 minutes à température ambiante. 200 µl de chloroforme glacial a été ajouté, mélangé vigoureusement et incubé pendant 3 minutes à température ambiante. Après une centrifugation à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C, le surnageant a été récupéré et 500 µl de chloroforme lui a été ajouté. Après centrifugation à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C, le surnageant a été récupéré et l'ARN total a été précipité dans 0.5 ml d'isopropanol sur glace pendant 30 minutes. Après une centrifugation à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4°C, le culot d'ARN total a été lavé dans de l'éthanol 70%, et resuspendu dans 50 µl d'eau stérile. La concentration de l'ARN total purifié a été déterminée en dosant sa densité optique à une longueur d'onde de 260nm (DO_{260nm}). L'ARN total du placenta humain et du testicule humain ont été achetés chez Clontech (Palo Alto, Californie, USA).

2.2 Réaction de transcription inverse (RT).

cinq µg d'ARN total a été utilisé pour la synthèse des ADNc. 1µg d'oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml), 4 µl de tampon 5 X (5 X First Strand Buffer, GibcoBRL), 2 µl de DTT 0.1M, 1 µl de dNTP 10 mM et 1 µl (200 unités) de l'enzyme transcriptase inverse SuperScript™II (GibcoBRL) ont été utilisés dans un volume final de 20 µl, pour assurer la synthèse des

ADN complémentaires. Après une incubation d'une heure à 37°C, 0.6 µl de RNase A (Boehringer Mannheim, Gaithersburg, USA) (1 mg/ml) a été ajouté et incubé à 37°C durant 30 minutes.

2.3 Amplification des régions 3' non-codantes de la calpastatine par réaction de polymérase en chaîne (PCR).

Les réactions de PCR ont été effectuées à partir des ADNs complémentaires obtenus par réaction de transcription inverse. Des oligonucléotides anti-sens, spécifique à chacune des régions 3' non-codantes et des oligonucléotides sens correspondant à des séquences du domaine 4 (D4) de la calpastatine et au segment C des régions 3' non-codantes de la calpastatine ont été synthétisés. De plus, des oligonucléotides sens et anti-sens spécifiques aux différents segments formant chacune des régions 3'UTRs de la calpastatine ont été synthétisés. Les mêmes oligonucléotides sens ont été synthétisés en leur ajoutant, en amont, les séquences du promoteur T7, pour amplifier toutes les régions 3'UTRs de la calpastatine renfermant les séquences du promoteur T7 en amont (voir tableau des amorces). Ces régions 3'UTRs modifiées ont servi plus tard comme matrice pour la transcription *in vitro* (voir section 2.7).

La réaction de PCR a été effectuée en utilisant l'enzyme Taq ADN polymérase (2 unités) (Pharmacia Biotech, USA), 0.3 µM de chaque amorce, 1 à 3 µl du cDNA synthétisé comme décrit plus haut, 1X de tampon de dilution (10X Taq dilution buffer, Pharmacia Biotech, USA), 0.2 mM de dNTPs dans un volume final de 100 µl. Une dénaturation de 5 min à 94°C suivie de 30 cycles d'amplification ont été nécessaires pour amplifier chaque région 3' non-codante (un cycle correspond à 40 secondes de dénaturation suivie

de 1 minute et demie d'hybridation à 62°C et de 2 minutes d'élongation à 72°C). Une électrophorèse sur gel d'agarose (1.5%) des produits de PCR a été effectuée.

2.4 Amplification des régions 3'UTRs de la calpastatine par la technique de 3'RACE (3' Rapid Amplification of cDNA Ends)

Pour étudier la diversité des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine et vérifier s'il en existe d'autres qui n'ont pas été encore identifiées, nous avons utilisé la technique 3'RACE qui permet d'amplifier des segments d'ADN dont les extrémités en 3' sont inconnues. Les réactions ont été effectuées tel que spécifié par le manufacturier de la trousse utilisée (GibcoBRL) : 5 µg d'ARN total de cellules HeLa, 2 µl de 10X PCR buffer, 2µl de 25 mM MgCl₂, 1µl de 10mM dNTP mix, 2µl de 0.1M DTT, 500mM de l'oligonucléotide AP (GibcoBRL) et 1µl de la transcriptase inverse SuperScript II. Les réactions ont été incubées pendant 50 minutes à 42°C. Par la suite, les réactions ont été terminées par incubation à 70°C pendant 15 minutes. 2 µl de l'ADNc synthétisé a été utilisé comme matrice d'ADN pour effectuer une réaction de PCR tel que décrit dans la section 2.3 en utilisant l'oligonucléotide sens D4F et l'oligonucléotide anti-sens UAP (GibcoBRL) (tableau 1). Une électrophorèse sur gel d'agarose (1.5%) des produits de PCR a été effectuée par la suite.

2.5 Sous-clonage et séquençage des produits de PCR.

Les produits de RT-PCR ont été purifiés à l'aide de tubes microconcentrateurs (Microcon 50, Amicon Inc., Beverly). Par la suite les fragments amplifiés (500 ng) ont été clonés dans le vecteur pGEM-T (100 ng) (pGEM-T vectors systems, Promega, Madison, USA) à

l'aide de la T4 ADN ligase (2 unités) (Promega) dans un volume final de 20 µl, pendant 14 heures à 16°C. Les vecteurs (10 µl) ont été transformés dans des bactéries compétentes *E.coli DH 10β*. Après culture à 37°C pendant toute la nuit sur Pétri, les colonies positives ont été repiquées et cultivées toute la nuit à 37°C dans 5 ml LB contenant 50µg/ml d'ampicilline. Par la suite les plasmides ont été extraits des bactéries transformées en utilisant la trousse Qiagen (QIAprep 8 Plasmid Kit, Qiagen Inc., Chatsworth). Les plasmides purifiés (1µg) ont été digérés par les enzymes de restriction *SacI* et *SacII* (2 unités) (Pharmacia Biotech, USA), 1X du tampon de dilution (10X One-for-all plus buffer, Pharmacia Biotech, USA) dans un volume final de 20µl pendant 2 heures à 37°C. Les produits de digestion ont été déposés sur gel d'agarose 1.5% pour vérifier le succès du sous-clonage. Les produits sous-clonés ont été séquencés tel que décrit plus bas.

Le séquençage des ADNc a été réalisé à l'aide d'un séquenceur automatique A.L.F.TM (Pharmacia, Uppsala, Suède) selon la technique didéoxysé (Sanger et al., 1977) en utilisant des amorces d'oligonucléotides fluorescents (Pharmacia, Uppsala, Suède) (Sheldon center, McGill university, Montréal). Les séquences nucléotidiques ont été comparées aux banques de données GenBank/EMBL. Les alignements entre les séquences de 3'UTRs de la calpastatine humaine et d'autres espèces ont été effectués en utilisant le programme BLAST du "National Center for Biotechnology Information" (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et le programme "multiple alignment" (<http://www.genebee.msu.su>). Les prédictions des structures secondaires des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine humaine, du porc, du bœuf, du mouton, du lapin et du rat ont été effectuées en utilisant l'algorithme de Zuker. Les différentes structures

secondaires obtenues ont été analysées par la suite dans le but d'identifier des structures particulières qui seraient conservées entre les différentes espèces.

2.6 Détermination de la stabilité des ARNms de la calpastatine

Des cellules HeLa (3×10^5 cellules/ml) ont été incubées en présence seulement d'actinomycine D (5 µg/ml) et en présence, simultanément, d'actinomycine D (5 µg/ml) et de cycloheximide (10 µg/ml) pour des périodes de 0 à 10 heures à 37°C dans du milieu RPMI complété avec 10% FBS et 1% de streptomycine/pénicilline. Par la suite les cellules ont été centrifugées 5 min à 1000 rpm et le culot a été lavé deux fois avec 5 ml de TBS (0.2 M tris base, 1.5 M NaCl). L'ARN total des cellules a été extrait par la suite, par la méthode du Trizol tel que décrit précédemment, et a été utilisé pour déterminer les demie-vies des ARNms de la calpastatine par technique de RT-PCR (protocoles décrits dans la section 2.3) et par buvardage Northern (voir section 2.7).

2.7 Buvardage northern (Northern Blot)

10 à 20 µg d'ARN total a été utilisé pour effectuer les expériences de buvardage Northern. L'ARN a été précipité pendant 10 minutes à -80°C dans deux-fois volume d'une solution d'éthanol /NaAc3 M (9/1), suivie d'une centrifugation à 13000 rpm pendant 15 minutes à 4 °C. après avoir retiré le surnageant, le culot a été séché 15 minutes à la température ambiante. Par la suite, 20 µl de "sample buffer" et 4µl de "loading buffer" (50% glycerol, 10 mM sodium phosphate pH 7.0) lui ont été ajoutés, suivie d'une incubation à 65 °C pendant 5 minutes. Ensuite les tubes ont été mis sur glace pendant 5 minutes et ont été centrifugés à 13000 rpm pendant une minute à 4 °C. Les échantillons

ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose dénaturant (2.15 g d'agarose, 25ml d'HEPES-EDTA 10X, 184,5 ml d'eau stérile et 40,5 ml de formaldéhyde) et transférés, par capillarité, sur membrane de Nylon N⁺ dans une solution de 10X SSC (1.5 M NaCl, 150 mM citrate tri-sodique) pendant 12-16 heures (Sambrook et al., 1989). La membrane a été fixée par la suite dans une solution 0.05 N NaOH pendant 5 min et lavée pendant 15 minutes dans une solution de 2X SSC (1.5 M NaCl, 150 mM citrate tri-sodique). Pour s'assurer que le transfert s'est bien déroulé, la membrane a été colorée pendant 3 minutes (jusqu'à l'apparition des bandes des ARN ribosomiaux 28S et 18S) dans une solution de coloration, et décolorée par la suite, à deux reprises, dans une solution de (0.2X SSPE, 10 % SDS) pendant 20 minutes. La membrane a été incubée par la suite dans du tampon d'hybridation (5 % SDS, 400 mM NaH₂ PO₄ pH 7.2, 1 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, 50 % formamide) à 42 °C pendant 1 heure. Par la suite, la membrane a été incubée, dans le même tampon d'hybridation, pendant au moins 12 heures à 42°C avec une sonde ADN marquée au α -³²P dCTP par le système de marquage radioactif "oligolabelling kit" (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). La membrane a été lavée pendant 15 minutes dans un premier tampon de lavage 1X SSC, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA, suivie d'un autre lavage de 15 minutes dans un deuxième tampon de lavage 0.2X SSC, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA. La membrane a été exposée dans une cassette à autoradiographie avec un écran contre un film BioMax (Kodak, NY).

2.8 Réaction de transcription *in vitro*

Les ADNc correspondants aux différentes régions 3'UTRs de la calpastatine et aux différents segments qui les constituent ont été amplifiée par RT-PCR (voir section 2.3).

Les oligonucléotides utilisés ont été modifiés de façon à introduire les séquences du promoteur T7 en amont des séquences amplifiées. les produits de PCR ont été utilisés directement comme matrice d'ADN pour la synthèse des ARNs correspondants aux différentes régions 3'UTRs de la calpastatine. De la même manière, une région de l'ARNm de la protéinase 3 a été synthétisée pour servir d'ARN contrôle dans les expériences de gel de retardement et de buvardage de type northwestern. Les réactions de transcription ont été effectuées en utilisant la trousse de transcription *in vitro* MEGAscript™ (Ambion, Austin, Texas, USA). 1 µg d'ADN a été utilisé comme matrice auquel ont été ajoutés, 7.5 mM d'ATP, 7.5 mM d'UTP, 7.5 mM de GTP, 3.75 mM de CTP, 40 µCi de α -³²P CTP (800 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA), 1X tampon de transcription (Ambion, USA) et 2 µl de ARN polymérase T7 (ambion, Austin, Texas, USA). Les réactions ont été complétées avec l'eau stérile pour avoir un volume finale de 20 µl et incubées pendant 12 à 16 heures à 37°C. L'ARN synthétisé a été chargé sur un gel d'acrylamide dénaturant (8% acrylamide, 40% d'urée) et séparé pendant 2 heures à 500V. Le gel a été exposé par la suite dans une cassette à autoradiographie avec un écran contre un film BioMax (Kodak, NY) pour une période de 20 secondes. L'ARN synthétisé a été extrait du gel en découpant la bande visualisée par autoradiographie et en la solubilisant à 4°C pendant 16 heures en agitation dans un tampon de solubilisation (0.3 M NaAc pH 5.2, 0.2% SDS). L'ARN a été purifié par méthode de phénol-chloroforme après avoir y ajouté 125 µg d'ARNt de levure (Sambrook et al., 1989).

2.9 Préparation d'extrait de protéines totales de cellules HeLa.

Des cellules HeLa en culture ($4-6 \times 10^5$ cellules/ml), ECV (en confluences) et de HL60 ($4-6 \times 10^5$ cellules/ml) ont été utilisées pour préparer des extraits protéiques. Les cellules ont été centrifugées 5min à 1000 rpm et le culot a été lavé deux fois avec 5 ml de TBS (0.2 M tris base, 1.5 M NaCl). Toute les manipulations suivantes ont été effectuées à 4°C. Les cellules ont été resuspendues dans du tampon Net-2 (50 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl) supplémenté avec 0.5 µg/ml de CLAP (chemostatine, leupeptine, antipain, et pepstatine) (Sigma, USA) et lysées par sonication avec 3 impulsions de 15 secondes chacune. Les fractions insolubles ont été éliminées par deux périodes de centrifugations de 20 minutes à 13000 rpm. Le surnageant, qui représente l'extrait total, a été transféré dans un nouveau tube.

2.10 Préparation des différentes fractions de protéines purifiées de cellules HeLa .

Des cellules HeLa en culture ($4-6 \times 10^5$ cellules/ml) ont été centrifugées 5 min à 1000 rpm et le culot a été lavés deux fois avec 5ml de TBS (0.2 M tris base, 1.5 M NaCl). Par la suite les cellules ont été resuspendues dans du tampon de chargement (40mM, 50mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl) supplémenté avec 0.05% Nonidet P-40, et lysées par sonication avec 3 impulsions de 15 secondes chacune. Les fractions insolubles ont été éliminées par deux périodes de centrifugations de 20 minutes à 13000 rpm. Le surnageant a été filtré à l'aide d'un filtre de 0.2 µm et chargé dans une colonne DEAE-HPLC ("DEAE high performance liquid chromatography") de 20×100 mm (Waters Millipore, Canada). Après plusieurs lavages avec le tampon de chargement, les protéines totales ont été éluées dans différentes fractions en utilisant le tampon de chargement contenant 80,

120, 150, 190, 240 et 290 mM de NaCl. Après l'addition de d'inhibiteur de RNase et de 0.5 µg/ml de CLAP, les protéines éluées ont été concentrées par dialyse contre du tampon de chargement (Pro-Di-Con, BioMolecular Dynamics, USA).

2.11 Réaction de gel de retardement (gel shift)

Les essais de gel de retardement ont été effectués tel que décrit par Walker et al, (1998). 5 µg/µl d'ARNt de levure a été ajouté à 5-20 µg d'extrait de protéines totales de cellules HeLa ou de fraction de protéines purifiées par colonne de DEAE-HPLC et incubé 2 minutes sur glace. Par la suite les réactifs suivant ont été ajouté : 0.5-1×10⁴ cpm d'ARN marqués au ³²P, 1X de tampon de liaison (50 mM HEPES pH 7.2, 15 mM MgCl₂, 25% glycérol, 5 mM DTT) et 100 mM KCl. Après une période d'incubation de 15 minutes sur glace, 10µg/µl d'héparine et 2µl de "loading buffer" 5X (48.5 % de glycérol, 0.5 % de bromophénol et de xylène cyanol) ont été ajoutés. Par la suite, les protéines ont été chargées sur un gel d'acrylamide (5.4 % acrylamide, 30% glycérol, dilués dans du tampon 1X TBE) et séparées pendant 4 à 8 heures à une intensité de 180 V. Par la suite, le gel a été exposé dans une cassette à autoradiographie avec un écran contre un film BioMax (Kodak, NY).

2.12 Préparation de membrane de protéines (pour les expériences de buvardage de type western et de type Northwestern)

5 à 20 µg d'extrait de protéines totales de cellules HeLa ou de fractions de protéines purifiées par colonne de DEAE-HPLC ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (7.5%), SDS-PAGE, en condition réductrice. Les protéines ont été

séparées sur gel contenant 7.5% d'acrylamide (ratio acrylamide/bisacrylamide de 30:0.8), 0.15 M Tris.Cl pH 8.8, 1% SDS, 0.05 ml persulfate d'ammonium (10%), et 0.01 ml TEMED dans 15 ml d'eau bidistillée et surmonté d'un gel de 4% d'acrylamide (ratio acrylamide/bisacrylamide de :30:0.8), 0.125 M Tris.HCl pH 6.8, 1% SDS, 0.025ml de persulfate d'ammonium(10%) et 0.005ml de TEMED dans 5 ml d'eau bidistillée. Les protéines ont été resuspendues dans du tampon de solubilisation contenant 2% SDS, 10% glycérol, 62.5 mM Tris-Cl pH 6.8, 5% 2-β mercaptoéthanol, et 0.001% de bleu de bromophénol, bouillies durant 5 minutes, centrifugées à 15000 rpm pendant 10 minutes, puis déposées au fonds des puits respectifs. L'électrophorèse a été effectuée à 120 volts durant 1 heure dans un tampon contenant 1% SDS, 25 mM Tris et 0.25 M glycine. Les marqueurs de masse moléculaire *Prestained low range* ou *broad range Standards* (Bio Rad Laboratories, USA) ont été utilisés, pour vérifier la taille des protéines.

La coloration au bleu de Coomassie a été effectuée pour vérifier les protéines avant le transfert. Brièvement, les gels ont été incubés dans une solution de coloration contenant 0.05% de bleu de Coomassie, 50% méthanol, 10% acide acétique glacial pendant 20 minutes, puis lavés avec une solution de décoloration contenant 50% méthanol, 10% acide acétique glacial pendant 30 minutes à 16 heures. Les gels ont été équilibrés dans du glycérol 10% et séchés sous vide à l'aide d'un séchoir de gel modèle 583 (BioRad Laboratories, Richmond, CA, USA).

Le transfert des protéines a été effectué sur une membrane de nitrocellulose (BioRad, CA) pendant 1 heure à 100 Volts dans un tampon de transfert contenant 25 mM Tris, 0.2 M glycine et 20% méthanol.

2.13 Essai de buvardage de type de northwestern

Les membranes de protéines préparées tel que décrit dans la section 2.11 ont été bloquées pendant une heure à la température ambiante, dans du tampon "northwestern" (10 mM Tris pH 7.4, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) supplémenté avec du 1X Denhardt's (400 µg/ml de Ficoll 400, 400 µg/ml polyvinylpyrrolidone et 400 µg/ml BSA), 1mg/ml d'héparine et 1 mM DTT. Après trois lavages de 15 minutes dans du tampon northwestern, la membrane a été incubée pendant 1 heure dans du tampon "northwestern" en présence de 10000 cpm d'ARN marqué au ^{32}P et 20 µg/ml d'ARNt de levure. Par la suite, la membrane a été lavée à trois reprises dans du tampon "northwestern" et exposée dans une cassette à autoradiographie avec un écran contre un film BioMax (Kodak, NY) (Wang et al., 1995).

2.14 Expression de la protéine La recombinante

Le clone pGEX4T-1-SS-B/La a été obtenu grâce à l'aimable collaboration du Dr. K.L. Chan (La Jolla, Californie). Le vecteur a été ensuite transformé dans les bactéries PR745 *lon⁻* (New England Biolabs, USA). Après culture à 37°C pendant toute la nuit sur boîte de Pétri, les colonies positives ont été repiquées et cultivées toute la nuit à 37°C dans 5ml Luria-Bertani (LB :1% tryptone, 0.5% extrait de levure, 0.5% NaCl) contenant 50µg/ml d'ampicilline. Pour confirmer les clones positifs, les plasmides ont été extraits des bactéries transformées en utilisant la trousse Qiagen (QIAprep 8 Plasmid Kit, Qiagen Inc., Chatsworth). L'expression de la protéine de fusion GST-SS-B/La a été induite par l'addition de 1 mM d'isopropyl-β-thiogalactopyranoside (IPTG) à la culture de bactéries transformées dont la densité optique à 595 nm ait atteint une valeur de 0.5-0.7. La culture

a été induite pendant 3-4 heures, et les bactéries ont été ensuite centrifugées à 3400 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le culot bactérien a été resuspendu dans 4 ml de 1X PBS (4.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM KH₂PO₄) contenant 1% de Triton X-100, 0.2 mM de phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) et 5 µg/ml de CLAP (chemostatin, leupeptin, antipain, et pepstatin) (Sigma, USA) pour 50 ml de culture. Les bactéries ont été lysées par sonication avec 3 impulsions de 30 secondes chacune. Une centrifugation de 10 minutes à 15000 rpm a été effectuée pour enlever les débris bactériens. Le surnageant a été prélevé et déposé sur une colonne de Glutathione Sépharose 4B pré-équilibrée dans le PBS (Pharmacia, Uppsala, Suède) à raison de 0.4 ml par 50 ml de culture. Après un lavage avec du PBS 1X (4.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM KH₂PO₄), la protéine de fusion a été clivée avec 50 U de thrombine (Sigma, USA) par ml de PBS, pendant 3 heures à température ambiante. La protéine recombinante a été conservée à -20°C pour une utilisation ultérieure dans des expériences de gel de retardement et de buvardages de types Western et Northwestern.

2.15 Buvardage de types Western

Les membranes de protéines préparées tel que décrit dans la section 2.11 ont été bloquées pendant 1 heure à température ambiante ou 16 heures à 4°C dans du PBS contenant 5% de lait en poudre, pH 7.3-7.4. La membrane a été ensuite incubée avec des anticorps monoclonaux anti-SS-B/La et avec un sérum anti-La humain d'un patient lupique, tous dilués dans du PBS (dilution 1:5000 pour anticorps monoclonaux de souris (don du Dr. K.L. Chan), et dilution 1:200 pour le sérum). Un anticorps secondaire anti-IgG de souris été utilisé avec les anticorps monoclonaux anti-SS-B/La (dilution 1/500).

Après 3 lavages de 10 minutes avec le tampon de lavage (PBS contenant 0.5% de lait en poudre), les membranes ont été incubées avec de la protéine-A couplée à la peroxydase, dilution 1:5000 (Sigma, USA) pendant 1 heure à la température de la pièce. Puis la membrane fut lavée quatre fois dans du tampon de lavage pendant 15 minutes à la température de la pièce. Ces complexes immuns ont été détectés par le système ECL (Amersham, USA) en exposant un film XAR (Kodak) pendant 30 secondes à 2 minutes.

Tableau I : Séquences des oligonucléotides utilisés pour amplifier les différentes régions 3'UTR de l'ARNm de la calpastatine ainsi que le domaine 4 codant et une région de l'ARNm de la protéinase 3.

Nom	Séquences 5' → 3'	Spécificité
CF	TACAAGTTAAGGTATCTGGTATCT	Segment C sens
CR	AGCTTTCTCTCCCAATTGAAGG	Segment C anti-sens
CF _{T7}	CGTAATACGACTCACTATAGGGTACAAGTTAAGGTATCTGGTATCT	Segment C sens
AF	GATAAAGTTTCTTAAAGCAACACC	Segment A sens
AR	GGAGTGGTTCCATTGTGTAG	Segment A anti-sens
AF _{T7}	CGTAATACGACTCACTATAGGGATAAAGTTTCTTAAAGCAACACC	Segment A sens
BF _{T7}	CGTAATACGACTCACTATAGGCATTCTTCAGTGTTCTGATTC	Segment B sens
BR	AATGCTTCCTGGTTTGTCCAG	Segment B anti-sens
TR	A AATCTAATTA ATTCTTAGGG	Segment T anti-sens
ZF	AGGACTTCTGCATCTTACAGTC	Segment Z sens
ZR	GGAGTGGTTCCATTGTGTAG	Segment Z anti-sens
ZF _{T7}	CGTAATACGACTCACTATAGGAGGACTTCTGCATCTTACAGTC	Segment Z sens
D4F	CTTCCAAGCCAAAAGATGACTAA	FIN Domaine 4 sens
D4F _{T7}	TAATACGACTCACTATAGGCTTCCAAGCCAAAAGATGACTAA	FIN Domaine 4 sens
PR3F _{T7}	CGTAATACGACTCACTATAGGGCTCGGTGGCTCAGGTGTT	PR3 sens
PR3R	CGTGAAGAAGTCAGGGAAAAG	PR3 anti-sens

3.0 Resultats

3.1 Amplification des différentes régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine

Étant donné que les différentes régions 3'UTRs de la calpastatine ont été clonées initialement par criblage de différentes bibliothèques d'ADNc humain (le 3'UTR II et le 3'UTR V : bibliothèque d'ADNc du placenta humain [El-Amine et al en préparation], le 3'UTR III : bibliothèque d'ADNc de cellules HeLa [T. Mimori et al., 1995] et le 3'UTR VI : bibliothèque d'ADNc de testicule humain [P.A.O'Hern et al., 1996]), il s'imposait donc, de vérifier, par RT-PCR à partir d'ARNm humain, que ces régions ne représentaient pas des artefacts de clonage. Nous avons démontré l'appartenance réelle, des régions 3'UTR II, 3'UTR III et 3'UTR V à l'ARNm de la calpastatine (El-Amine et al en préparation).

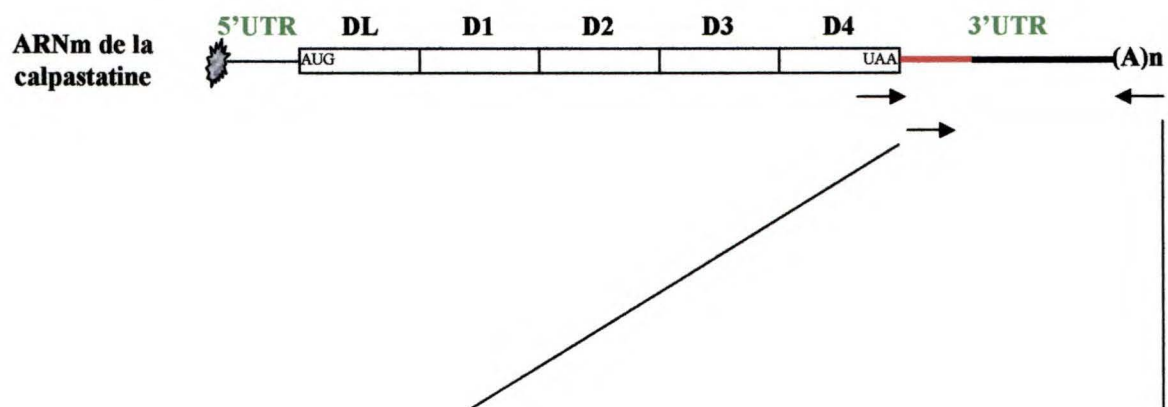
Dans la présente étude, nous avons procédé à des expériences de RT-PCR dans le but de démontrer l'appartenance de la région 3'UTR VI à l'ARNm de la calpastatine. Les oligonucléotides D4F (sens) et TR (anti-sens) (voir tableau I) ont été utilisés pour amplifier cette région 3'UTR de l'ARNm de la calpastatine, en utilisant l'ADNc du testicule humain. Cette région 3'UTR a été retrouvée initialement au niveau de l'isoforme testiculaire (histo-spécifique) de l'ARNm de la calpastatine qui a été cloné par O'Hern et al. (1996) à partir de la bibliothèque d'ADNc de testicule humain. La bande obtenue était de taille plus grande (810 pb) que celle attendue (531 pb) (figure 6B). Après séquençage, il s'est avéré que le produit d'amplification obtenu n'était pas la région 3'UTR VI de la calpastatine attendue, mais plutôt une nouvelle région 3'UTR, jusqu'à là inconnue, qui possède elle aussi le segment T dans l'extrémité 3'. Cette nouvelle région 3'UTR a été nommée 3'UTR IV, et a été retrouvée par la suite dans plusieurs autres tissus (placenta,

FIGURE 5 LES DIFFÉRENTES RÉGIONS 3'UTRs DE L'ARNm DE LA CALPASTATINE

(A) Représentation schématique de l'ARNm de la calpastatine montrant les oligonucléotides sens et anti-sens (flèches noires) utilisés pour amplifier, par PCR, les six différentes régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine.

(B) Les segments de mêmes couleurs possèdent une homologie de séquence de 100 %.

A



B

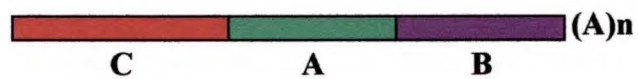
3UTRs I
(273 pb)



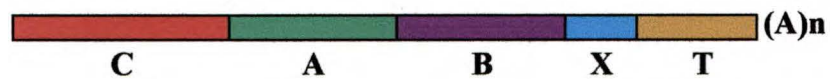
3UTRs II
(470 pb)



3UTRs III
(617 pb)



3UTRs IV
(810 pb)



3UTRs V
(711 pb)



3UTRs VI
(531 pb)

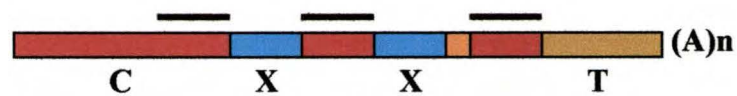
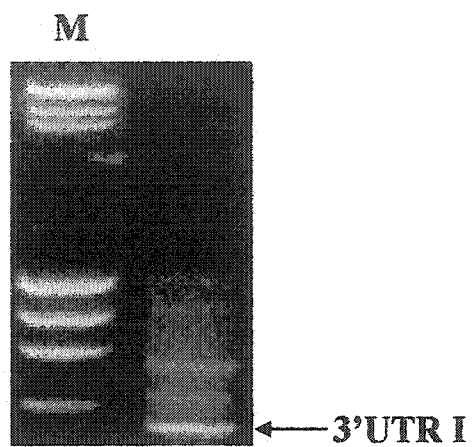


FIGURE 6 IDENTIFICATION DE DEUX NOUVELLES RÉGIONS 3'UTRs DE L'ARNm DE LA CALPASTATINE.

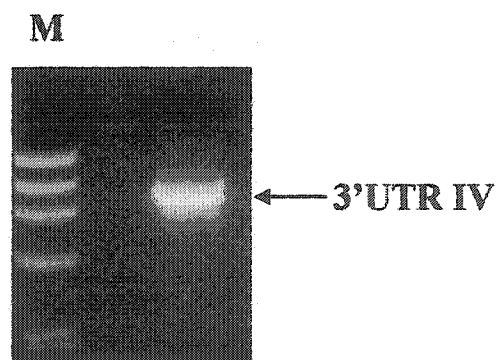
(A) Deux nouvelles régions 3'UTRs de la calpastatine ont été clonées par technique de 3'RACE et technique de PCR. La technique de 3'RACE permet d'amplifier des extrémités 3', dont les séquences sont inconnues, en utilisant un oligonucléotide anti-sens non spécifique. Ainsi, cette technique nous a permis d'isoler une nouvelle région 3'UTR, qui représente la plus petite région 3'UTR que l'ARNm de la calpastatine peut posséder; le 3'UTR I.

(B) Isolation de la région 3'UTR IV. A l'aide d'un oligonucléotide anti-sens spécifique au 3'UTR VI, et en utilisant l'ADNc du testicule humain, nous avons isolé une nouvelle région 3'UTR de l'ARNm de la calpastatine; le 3'UTR IV. Cette dernière constitue la plus longue région 3'UTR que l'ARNm de la calpastatine peut posséder. (M) marqueur de longueur d'ADN.

A



B



ostéoblaste et cellules HeLa [résultats non-montrés]). D'autres tentatives pour amplifier la région 3'UTR VI ont échoué, probablement à cause du fait que l'oligonucléotide anti-sens utilisé, TR, pouvait s'associer avec la région 3'UTR IV et la région 3'UTR VI, et perdait ainsi sa spécificité.

Les expériences de 3'RACE ont été effectuées dans le but de vérifier l'existence d'autres régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine. Ceci nous a permis d'isoler une nouvelle région 3'UTR qui est constituée du segment C seulement (la queue poly(A) a été retrouvée à l'extrémité 3') (figure 6A). En effet, on a pu cloner une région 3'UTR d'une longueur de 273 pb, constituant ainsi la plus courte région 3'UTR que l'ARNm de la calpastatine peut posséder. Cette région 3'UTR a été nommée 3'UTR I. Ainsi, l'ARNm de la calpastatine peut posséder six différentes régions 3'UTRs (figure 5 B)

3.2 Les régions 3' non-codantes de la calpastatine chez d'autres espèces.

Les séquences des ARNms de la calpastatine de l'humain, du porc, du bœuf, du mouton, du lapin et du rat, publiées dans la banque de données GenBank, ont été alignées pour étudier le degré de conservation des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine à travers toutes ces espèces. Le tableau II montre les pourcentages d'homologies entre les différents segments qui constituent les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine de l'humain et celles de l'ARNm de la calpastatine des autres espèces animales. Une homologie moyenne variant de 81% à 83% existe entre les régions codantes de l'ARNm de la calpastatine humaine et celles des ARNms des autres espèces. Quand au segment C des régions 3'UTR de la calpastatine humaine, débutant immédiatement après le codon de terminaison pour atteindre une taille de 273 pb, il est

Tableau II : Pourcentage d'homologie entre les séquences codantes et non-codantes (différents segments des régions 3'UTRs) de l'ARNm de la calpastatine humaine et les séquences codantes et non-codantes de l'ARNm de la calpastatine d'autres espèces.

Espèces	Regions codantes	C	A	B	Z & T
Cochon	83	79	92	85	-
Bœuf	81	78	92	82	-
Mouton	82	89	-		-
Lapin	81	90	92	85	-
Rat	81	90	-	-	-

présent sur l'ARNm de la calpastatine chez toutes les autres espèces. Ce segment C montre une homologie variant de 79% à 90% entre les ARNm de la calpastatine humaine et celles des autres espèces. De plus le segment C de la région 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine est retrouvé à la même position chez toutes les espèces, soit après le codon de terminaison. Le segment A est retrouvé, à une homologie de 92%, sur l'ARNm de la calpastatine du cochon, du bœuf et du lapin. Aussi, le segment B est retrouvé avec une homologie de 82% à 85% sur l'ARNm de la calpastatine du cochon, du bœuf et du lapin. Malheureusement, les séquences d'ADNc de la calpastatine de ces espèces, publiées dans la banque de donnée GenBank, semblent être incomplètes, puisque, pour la plupart de ces ADNc, on n'observe pas de queue poly(A). La majorité des groupes de recherche qui ont cloné ces ADNc ne s'intéressaient qu'aux séquences codantes, et arrêtaient donc de séquencer au delà des régions codantes. En plus, le nombre d'ADNc cloné par espèce reste faible pour pouvoir juger de la présence de plusieurs isoformes des régions 3'UTR chez ces espèces. Ainsi, on n'a pas observé la présence des segments Z et T sur les ARNms des autres espèces publiés dans la banque de donnée GenBank.

3.3 Analyses structurales des régions 3'UTRs des ARNms de la calpastatine humaine et d'autres espèces

Nous avons vérifié si les homologies de séquences observées entre les régions 3'UTRs de la calpastatine humaine et d'autres espèces révélaient des homologies de structures. Pour ce faire, nous avons soumis les séquences des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine de l'humain, du porc, du bœuf, du mouton du lapin et du rat à une analyse par l'algorithme de Zucker, dans le but d'établir les prédictions de leurs structures

FIGURE 7 ANALYSE DES STRUCTURES SECONDAIRES DES RÉGIONS 3'UTRS DES ARNm DE LA CALPASTATINE HUMAINE ET D'AUTRES ESPÈCES.

(A) Les régions 3'UTRs des ARNm de la calpastatine humaine et d'autres espèces (bœuf, porc, mouton, lapin et rat) ont été analysées à l'aide de l'algorithme de Zucker dans le but d'établir leurs structures secondaires. Seule la structure complète du 3'UTR II de l'ARNm de la calpastatine de l'humain est montrée.

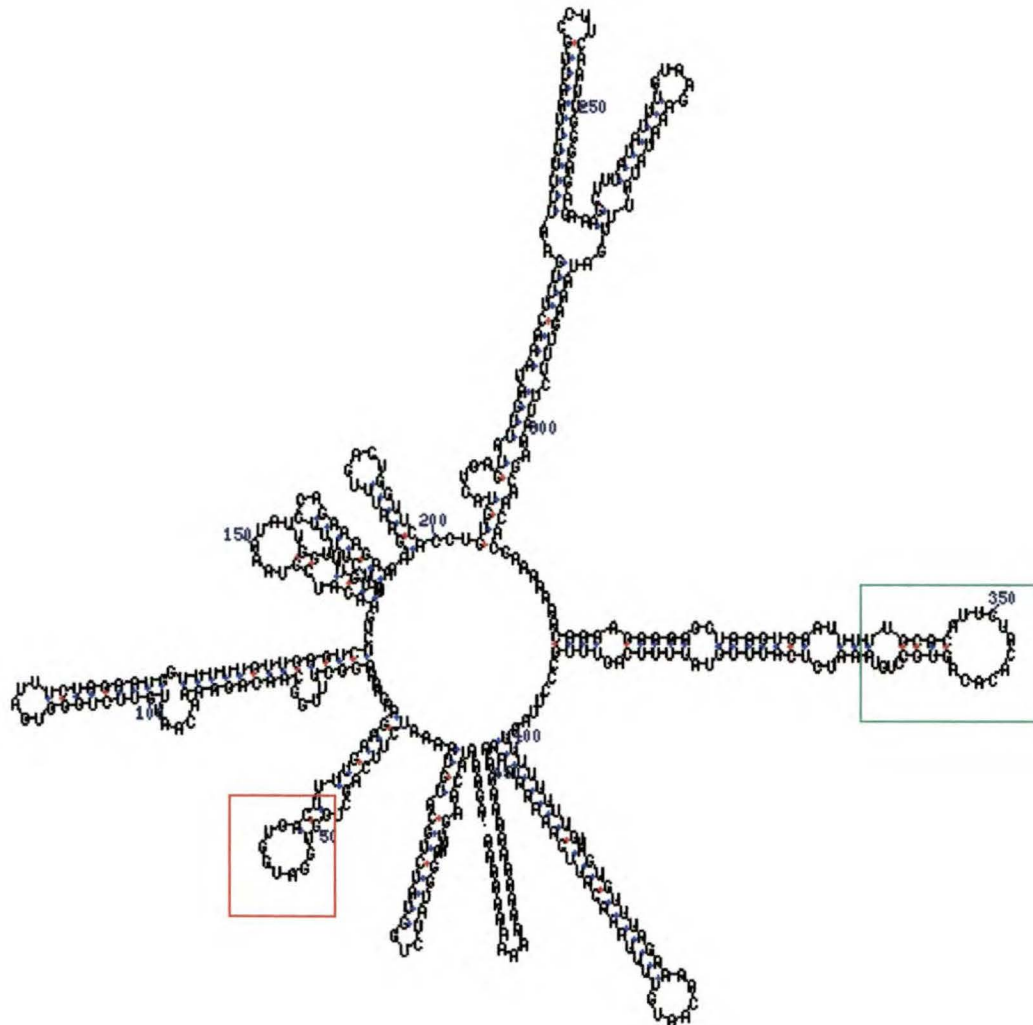
(B) Deux structures de type tige-boucle (stem-loop) sont conservées dans les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine de l'humain, du bœuf, du porc, du mouton, du lapin et du rat. La tige-boucle C est localisée dans le segment C, tandis que la tige-boucle A est localisée dans le segment A des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine.

plt22gif by D. Stewart and M. Zuker

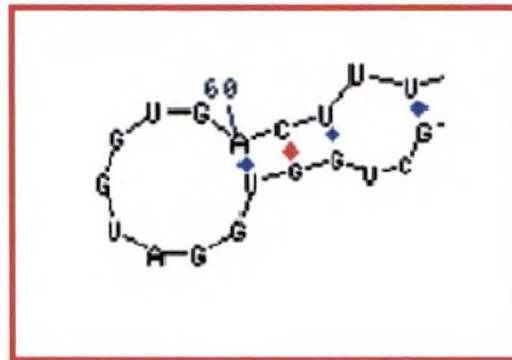
© 1998 Washington University

3'UTR II de l'ARNm de la calpastatine

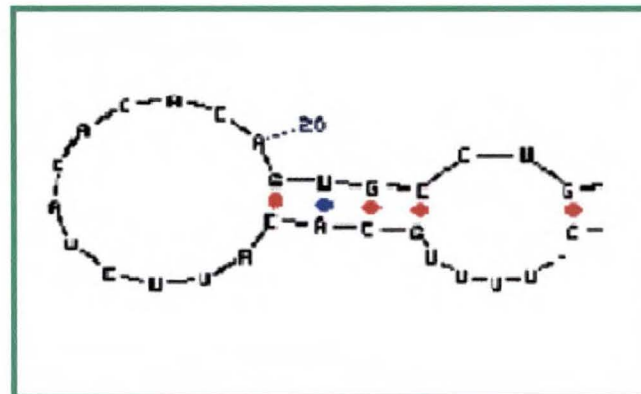
A



ENERGY = -87.4



Tige-Boucle C



Tige-Boucle A

secondaires. Les structures secondaires obtenues ont été analysées pour vérifier la présence d'éléments structuraux particuliers qui seraient conservés dans les régions 3'UTRs des ARNms de la calpastatine de toutes les espèces. Ainsi, deux structures de type tige-boucle (stem-loop) ont été identifiées (Figure 7). Une première structure de type tige-boucle (tige-boucle C) est présente au niveau du segment C. Cette dernière est conservée dans les régions 3'UTRs des ARNms de la calpastatine de l'humain, du cochon, du bœuf, du mouton, du lapin et du rat. Une deuxième structure de type tige-boucle (tige-boucle A) est présente au niveau du segment A. Cette dernière est conservée dans les régions 3'UTRs des ARNms de la calpastatine de l'humain, du cochon, du bœuf et du lapin.

3.4 Diversité des ARNms de la calpastatine

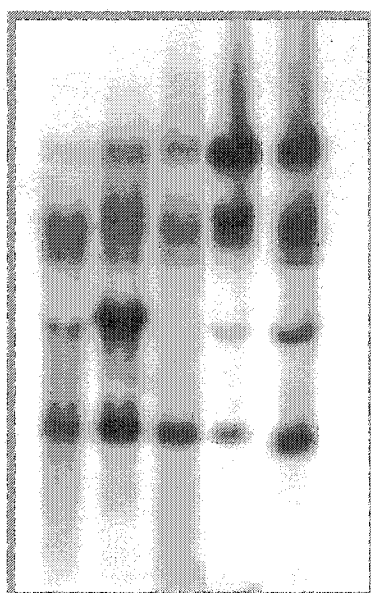
Des expériences de buvardage de type Northern effectuées par El-Amine et al (1998) ont montré qu'il existe deux transcrits ubiquiste majeurs de la calpastatine dans différents tissus humains, un transcrit d'une taille de 4.9 kb et un autre d'une taille de 3.3 kb. Il a confirmé aussi la présence d'un transcrit tissu-spécifique d'une taille de 1.8 kb dans le testicule humain.

En modifiant les conditions du buvardage de type Northern, on a pu montrer l'existence d'un nouveau transcrit d'environ 1 kb, détecté à l'aide d'une sonde correspondant au domaine 4 codant (Figure 8). En effet une bande, correspondant à un transcrit de 1 kb, a été observée en utilisant l'ARN total humain provenant des cellules HeLa, du testicule, du placenta, des ostéoblastes et des cellules ECV. Les cellules HeLa, les ostéoblastes et les cellules ECV expriment de façon variable un transcrit de taille légèrement plus petite

FIGURE 8 DIVERSITÉ DES TRANSCITS DE LA CALPASTATINE

Buvarpage de type Northern. Une sonde correspondant au domaine 4 (dernier domaine codant en 3') de la calpastatine a été utilisée pour détecter les différents isoformes des transcrits de la calpastatine dans les cellules HeLa (1), testicule humain (2), placenta humain (3), ostéoblastes (4) et les cellules endothéliales ECV (5). Quatre populations de transcrits, de tailles différentes, existent dans ces différents tissus, 4.9 kb, 3.3 kb, 1.8 kb (isoforme spécifique au testicule), 1.7 kb et 1 kb.

1 2 3 4 5



— 4.9 kb

— 3.3 kb

— 1.7 kb

— 1 kb

(1.7 kb) que le transcrit spécifique au testicule humain (1.8 kb). Il est difficile de vérifier s'il ne s'agit pas du même transcrit. Mais, étant donné qu'il s'agit de cellules transformées, il est possible que ces dernières expriment de façon constitutive toutes les isoformes de la calpastatine. De plus, ce transcrit, n'a pas été observé dans les cellules du placenta.

Cette expérience nous montre aussi, qu'il existe une expression différentielle des différents transcrits de la calpastatine chez ces différentes cellules. Ainsi, les cellules HeLa semblent avoir une plus forte expression du transcrit de 3.3 kb et une très faible expression du transcrit de 4.9 kb. Tandis que, chez les cellules du testicule humain, la majorité des transcrits de la calpastatine est représentée par l'isoforme de 1.8 kb spécifique au testicule. Chez les cellules du placenta humain, le transcrit de 1 kb semble être plus abondant que tous les autres transcrits. Chez les ostéoblastes et les cellules ECV, l'expression des transcrits de 4.9 kb et 3.3 kb semble être beaucoup plus forte que chez les cellules HeLa, les cellules du testicule humain et les cellules de placenta humain.

3.5 Études de stabilité de l'ARNm de la calpastatine

Pour déterminer la demie-vie des transcrits de la calpastatine et vérifier l'influence des différentes régions 3'UTRs sur leur stabilité, nous avons procédé à des études classiques de stabilité en utilisant l'inhibiteur de la transcription; l'actinomycine D. Ainsi, après une incubation des cellules HeLa en présence de d'actinomycine D, l'ARN total a été extrait des cellules et a été analysé par des expériences de buvardage de type Northern, en utilisant une sonde correspondant au domaine 4 (codant), et aussi par RT-PCR, en

FIGURE 9 STABILITÉ DES ARN_{ms} DE LA CALPASTATINE EN FONCTION DES RÉGIONS 3'UTRs QU'ILS CONTIENNENT

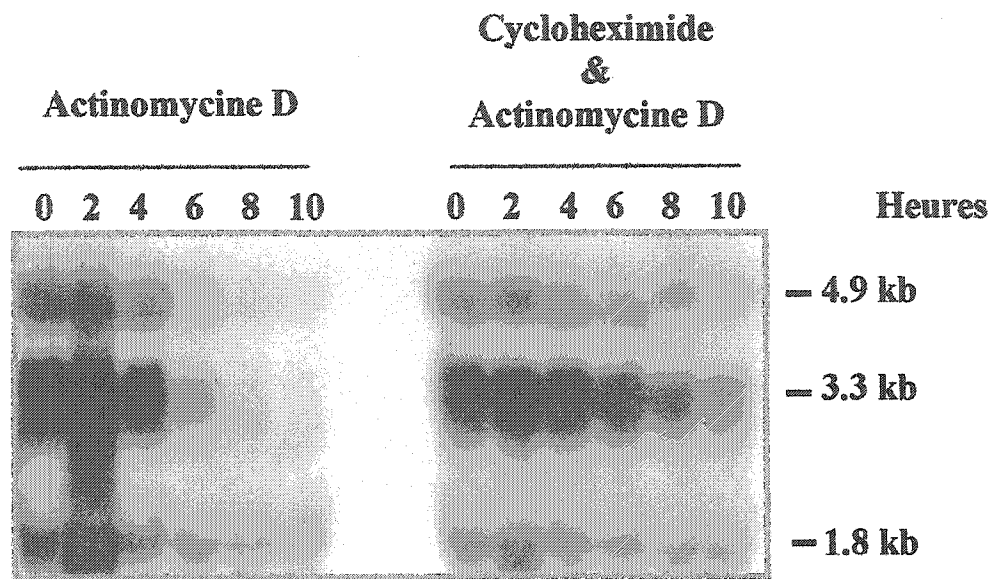
Des cellules HeLa ont été incubées en présence d'actinomycine D (5 µg/ml) seule ou d'actinomycine D et de cycloheximide (10 µg/ml) , pour des périodes de 0 à 10 heures.

(A) Par la suite l'ARN total des cellules a été extrait et les demi-vies des ARN_{ms} de la calpastatine ont été déterminées par buvardage de type Northern, en utilisant une sonde correspondant au domaine 4 (la présence de quantités égales d'ARN total dans chaque piste a été vérifiée par coloration de la membrane et détection des ARN ribosomiaux 18S et 28S).

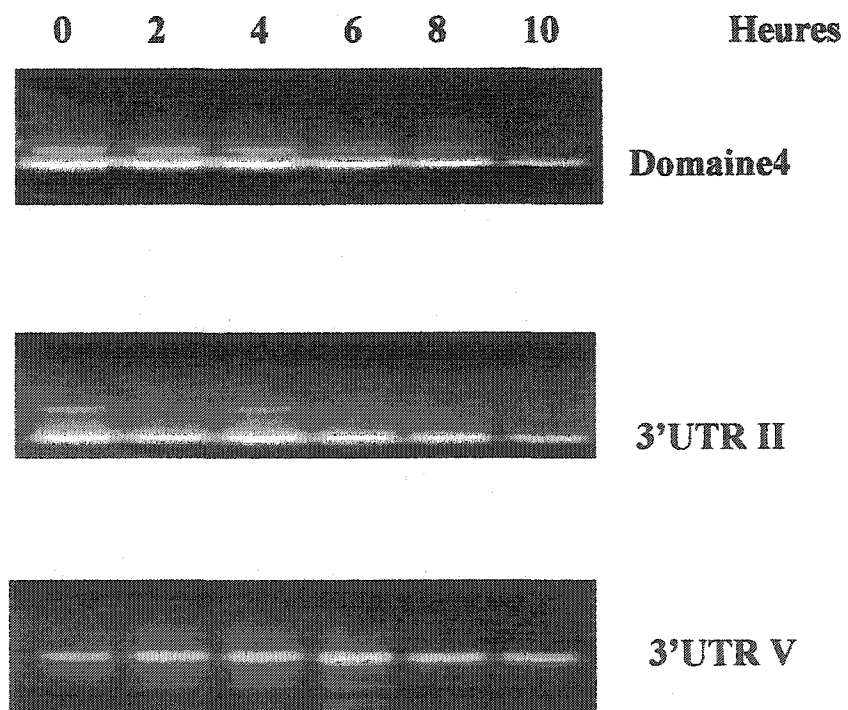
(B) Dans le but de déterminer si les demi-vies des ARN_{ms} de la calpastatine sont influencées par les régions 3'UTRs qu'ils contiennent, des expériences de RT-PCR ont été effectuées, en utilisant l'ARN total extrait des cellules traitées comme décrit au dessus et des oligonucléotides spécifiques au domaine 4, au 3'UTR II et au 3'UTR V (l'utilisation de quantités égales d'ADNc dans chaque réaction de RT-PCR a été vérifiée par dosage des acides nucléiques à 260 nm).

L'utilisation d'une sonde GAPDH comme témoin dans cette expérience était impossible à cause de la demie-vie de l'ARNm de la GAPDH qui n'est pas supérieur à 10 heures.

A



B



utilisant des oligonucléotides spécifiques au domaine 4 et aux différentes régions 3'UTRs de la calpastatine.

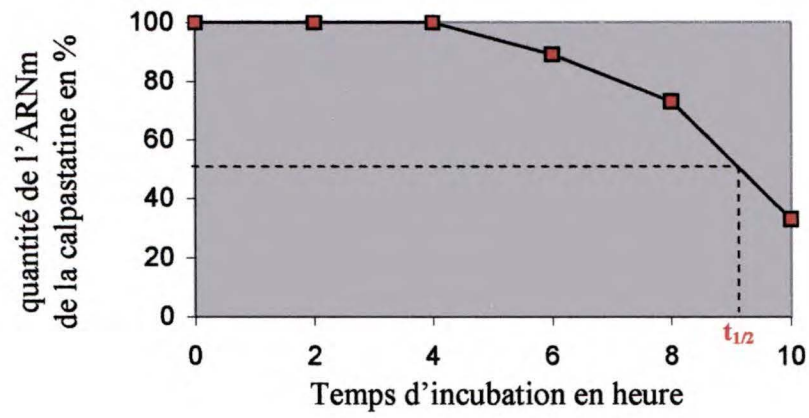
Les expériences de buvardage de type Northern nous ont permis de démontrer que les demi-vies des deux transcrits ubiquitaires de 4.9 kb et de 3.3 kb étaient semblables et qu'elles étaient d'environ 5 heures (figure 9 A) . Par ailleurs, en amplifiant le domaine 4 par RT-PCR, la demie-vie obtenue était d'environ 8 heures et demie (Figure 9B, et Figure 10). Ceci est probablement dû au fait que la technique de RT-PCR est beaucoup plus sensible et, qu'en amplifiant le domaine 4, la bande obtenue pourrait être l'accumulation des produits d'amplification du domaine 4 de plusieurs isoformes différents de l'ARNm de la calpastatine.

La stabilité des ces deux transcrits de la calpastatine est influencée par des facteurs protéiques cellulaires. En effet, lorsqu'on inhibe la traduction, en pré-incubant les cellules en présence de cycloheximide, les demie-vies des deux transcrits ubiquitaires augmentent et atteignent une valeur d'environ 8 heures (Figure 9A). Ceci voudrait dire qu'en temps normal, la cellule produirait des facteurs protéiques qui joueraient un rôle de déstabilisation de l'ARNm de la calpastatine. Ces facteurs semblent avoir le même effet sur toutes les différentes isoformes de l'ARNm de la calpastatine.

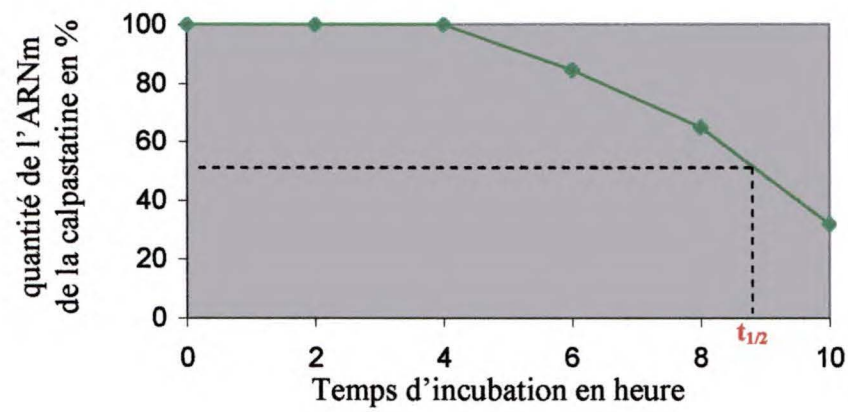
Afin de vérifier l'influence des régions 3'UTRs sur la stabilité des ARNms, nous avons amplifié par RT-PCR ces régions en utilisant l'ARN total extrait des cellules traitées à l'actinomycine D. Les ARNms de la calpastatine possédant la région 3'UTR V ont une demi-vie d'à peu près 10 heures, alors que ceux qui possèdent la région 3'UTR II, la région 3'UTR III ou la région 3'UTR IV, ont une demi-vie d'environ 8 heures et demie (Figure 9B et Figure 10).

FIGURE 10 STABILITÉ DES TRANSCRITS DE LA CALPASTATINE DÉTERMINÉE PAR DENSITOMÉTRIE

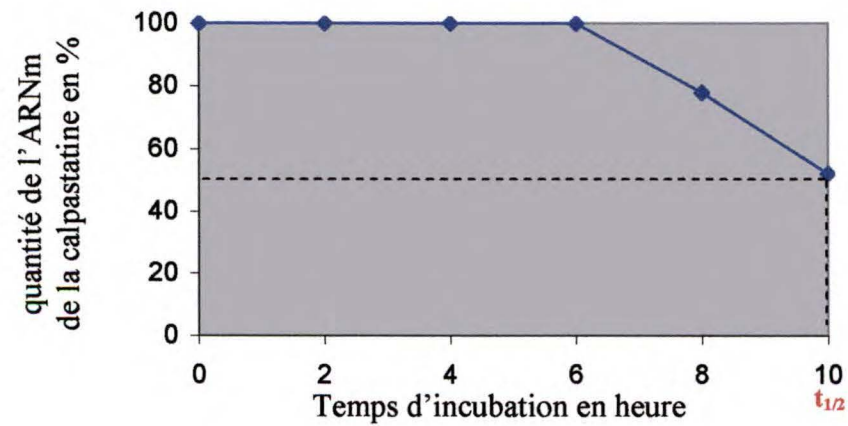
Les demi-vies des transcrits de la calpastatine, amplifiés par RT-PCR (Figure 9), ont été déterminées par densitométrie. Les ARNms de la calpastatine qui contiennent le domaine 4 et la région 3'UTR II semblent avoir une demi-vie d'environ huit heures et demie, alors que les transcrits qui possèdent la région 3'UTR V semblent être légèrement plus stable puisqu'ils ont une demi-vie d'environ dix heures.



Domaine 4



Région 3'UTR II



Région 3'UTR V

Donc, la stabilité des différents isoformes de l'ARNm de la calpastatine n'est pas affectée grandement par les différentes régions 3'UTRs.

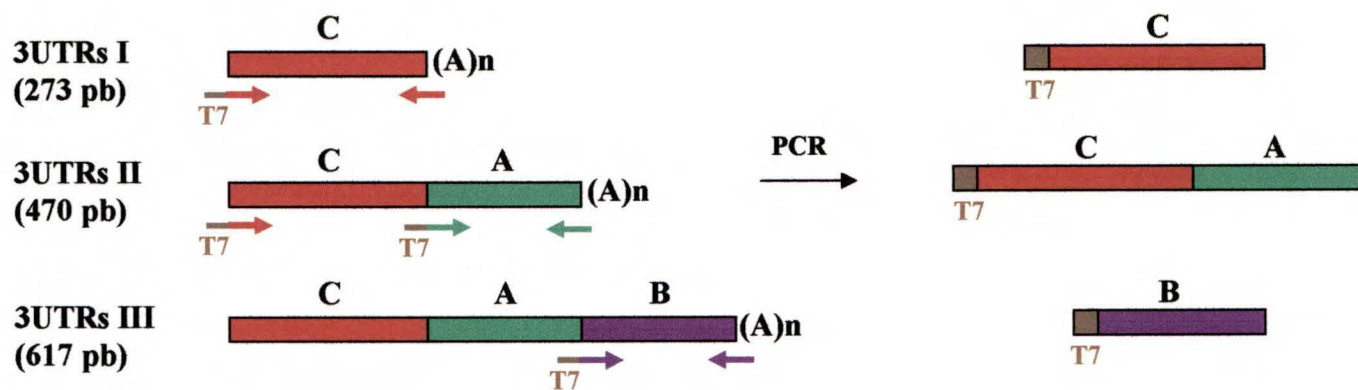
3.6 Interactions de type ARN-protéine impliquant les régions 3'UTRs de la calpastatine.

Étant donné la grande diversité des régions 3'UTRs de la calpastatine, on ne pouvait pas toutes les inclure dans les expériences visant à vérifier leurs interactions éventuelles avec des facteurs protéiques cellulaires. Les régions 3'UTR I, 3'UTR II et le 3'UTR III semblent former une classe de 3'UTR de la calpastatine qui est plus abondante dans les différents tissus humains (El-Amine et al, en préparation), et qui est présente chez la majorité des espèces dont la séquence de l'ARNm de la calpastatine est connue. Ces régions ont été alors amplifiées par PCR, en ajoutant les séquences du promoteur T7 à leur extrémités 5' (figure 11 A et B). Les régions 3'UTRs transcrites (Figure 11C) ont été utilisées dans des expériences de gel de retardement et de buvardage de type Northwestern. Le principe des expériences de gel de retardement est basé sur la comparaison entre la migration de l'ARN marqué au ^{32}P (région 3'UTR dans cette étude) et la migration des complexes ARN-protéine(s) formés lors de l'incubation de l'ARN avec des extraits cellulaires. Ce type d'expérience peut nous informer sur la formation de complexes ARN-protéines, mais ne peut pas, par contre, nous indiquer les tailles et le nombre de protéines impliquées dans ces interactions. Seules les expériences de buvardage de type northwestern ou d'UV pontage aux ultraviolets peuvent nous fournir de telles informations.

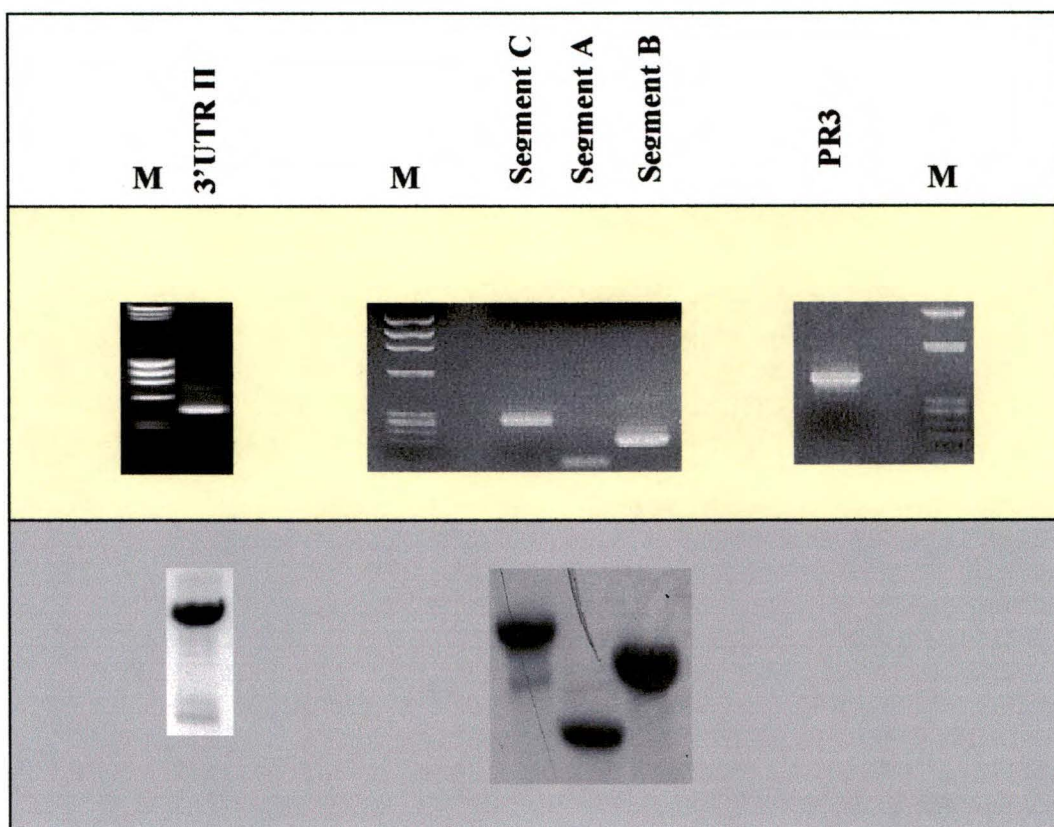
FIGURE 11 STRATÉGIE ADOPTÉE POUR LA SYNTHÈSE DES MATRICES D'ADN UTILISÉES POUR LA TRANSCRIPTION DES DIFFÉRENTES RÉGIONS ET SEGMENTS 3'UTRs DE L'ARNm DE LA CALPASTATINE.

Les matrices utilisées pour transcrire les différentes régions et segments 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine ont été préparées par RT-PCR en utilisant des oligonucléotides sens auxquels ont été ajoutées les séquences du promoteur T7 en 5' (A). Les produits de PCR (B) ont été alors directement utilisés pour synthétiser les régions 3'UTRs par transcription *in vitro* (C). (M) marqueur de longueur d'ADN.

A



B



3.6.1 Interactions entre le 3'UTR II et des facteurs cytoplasmiques

Des interactions de type ARN-protéine ont été observées par des expériences de gel de retardement lorsque l'ARN correspondant à la région 3'UTR II de la calpastatine a été incubé avec l'extrait de protéines totales de cellules HeLa, l'extrait de protéines semi-purifiées 40-150 mM NaCl et l'extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl (Figure 12A). Par ailleurs, ces résultats ne peuvent nous indiquer ni le nombre ni les tailles des protéines impliquées dans ces interactions.

Ainsi, un complexe ARN-protéine(s) a été observé lors de l'utilisation de l'extrait de protéines semi-purifiées 40-150 mM NaCl dans des expériences de gel de retardement. D'autres protéines présentes dans l'extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl interagissent avec la région 3'UTR II pour former deux complexes dont la migration est plus rapide que celle du complexe observé lors de l'utilisation de l'extrait de protéines totales de cellules HeLa et l'extrait de protéines semi-purifiées 40-150 mM NaCl (figure 12 A).

Les résultats de buvardage de type Northwestern ont montré que, la région 3'UTR II est capable de lier une protéine de poids moléculaire de 84 kDa présente dans l'extrait total des cellules HeLa et dans l'extrait de protéines semi-purifiées 40-150 mM NaCl (Figure 12B). Nous avons nommé cette protéine CASTRBP84 (calpastatine RNA binding protein 84).

De plus, les résultats des expériences de buvardage de type Northwestern montrent que la région 3'UTR II est capable de lier trois protéines de poids moléculaires de 49 kDa, 39 kDa et 26 kDa, présentes dans l'extrait de protéines totales des cellules HeLa et dans

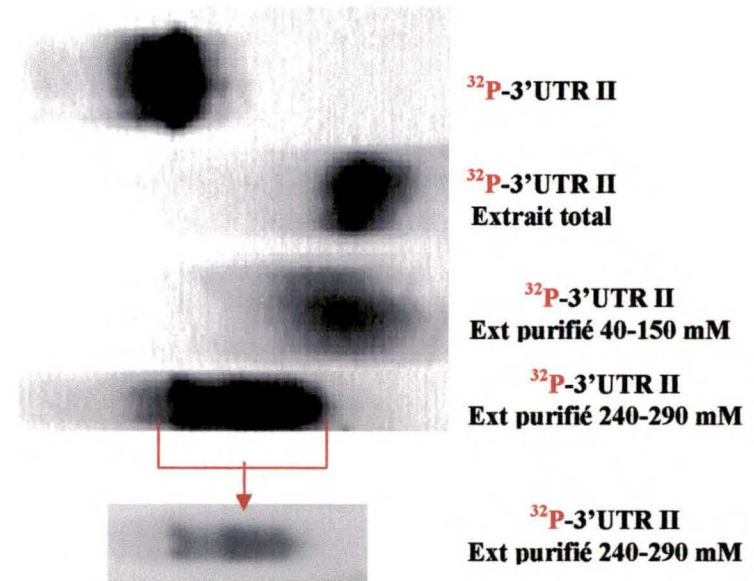
FIGURE 12 INTERACTIONS DE TYPE ARN-PROTÉINE ENTRE LE 3'UTR II ET DES FACTEURS PRÉSENTS DANS LES EXTRAITS DE CELLULES HeLa.

(A) Expérience de gel de retardement. L'ARN marqué au ^{32}P correspondant à la région 3'UTR II, a été incubé en présence d'extrait de protéines totales des cellules HeLa, d'extrait de protéines purifiées 40-150 mM NaCl, et d'extraits de protéines purifiées 240-290 mM NaCl.

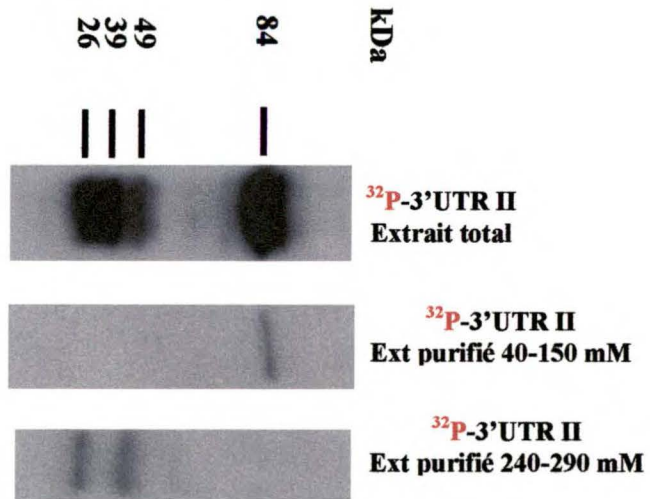
(B) Les facteurs protéiques impliqués dans les retardements de migrations, observés lors de ces expériences de gel de retardement, ont été caractérisés par des expériences de buvardage Northwestern.

Ainsi, quatre protéines peuvent interagir avec la région 3'UTR II. La protéine CASTRBP84, de poids moléculaire de 84 kDa, est présente dans l'extrait de protéines totales et dans l'extrait de protéines purifiées 40-150 mM NaCl. Alors que les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26, de poids moléculaire de 49, 39 et 26 kDa, sont présentes dans l'extrait de protéines totales et dans l'extrait de protéines purifiées 240-290 mM NaCl.

A



B



l'extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl (figure 12 B). Les trois protéines ont été nommées CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26, respectivement. Ces protéines sont donc présentes dans l'extrait de protéines totales et dans l'extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl, et sont absentes dans l'extrait de protéines semi-purifiées 40-150 mM NaCl (figure 12 B).

Les interactions observées par buvardage Northwestern ont détectées seulement dans les extraits où des interactions ont été observées par expérience de gel de retardement. Ainsi, il est clair que les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 ne peuvent être impliquées dans la formation du complexe ARN-protéine(s), de migration plus lente, observé lors de l'utilisation de l'extrait de protéines semi-purifiées 40-150 mM NaCl. en effet, les résultats de buvardage northwestern montrent leur absence dans cet extrait. De plus, l'absence de la protéine CASTRBP84 dans l'extrait 240-290 mM NaCl exclus son implication dans la formation des deux complexes ARN-Protéine(s) observés lors de l'utilisation de cet extrait dans des expériences de gel de retardement.

Cependant, on a remarqué que lorsque l'extrait de protéines totales est utilisé en expérience de gel de retardement, seule la formation du complexe "3'UTR II- CASTRBP84" est observé (figure 12 A), alors que, même si les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 sont présentes dans cet extrait, elles ne forment pas de complexes avec le 3'UTR II de l'ARNm de la calpastatine. Pourtant, on a observé des interactions entre la région 3'UTR II et les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 lorsqu'on utilise ce même extrait dans des expériences de buvardage de type Northwestern (figure 12 B). Ainsi, l'expérience de gel de retardement permet l'observation des interactions entre le 3'UTR II et les protéines CASTRBP49,

CASTRBP39 et CASTRBP26 seulement lorsque l'extrait de protéines utilisé (extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl) ne contient pas la protéine CASTRBP84.

L'incubation des différents extraits protéiques en présence de la protéinase K avant leur utilisation dans les expériences de gel de retardement et de buvardage de type northwestern résultait dans la perte de la formation des complexes observés. Ceci confirme la nature protéique de ces facteurs qui interagissent avec la région 3'UTR II de la calpastatine.

Par la suite, on a synthétisé trois différents segments des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine, soit le segment C, le segment A et le segment B (figure 11), pour vérifier leur capacité à lier les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.

3.6.2 Interactions entre le 3'UTR I (segment C) et les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26

La région 3'UTR I constitue la plus courte région 3' non-traduite de l'ARNm de la calpastatine puisqu'elle n'est constituée que du segment C (Figure 5). Ce dernier lie une protéine présente dans l'extrait de protéines totales des cellules HeLa. Cette interaction a été observée par expérience de gel de retardement (Figure 13A). Cependant aucune interaction n'a été observée lorsque l'extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl a été utilisé (Figure 13A).

Par contre, les expériences de buvardage de type Northwestern, montrent que le 3'UTR I lie fortement les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 présentes dans l'extrait de protéines totales de cellules HeLa (Figure 13B). Aussi, des

interactions entre la région 3'UTR I et les protéines CASTRBP49 et CASTRBP39 ont été observées par expérience de buvardage Northwestern lorsque l'extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl a été utilisé (Figure 13 B). Ces résultats pourraient suggérer que le segment C est responsables des interactions observées entre la région 3'UTR II et les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.

3.6.3 Interactions entre le segment A et les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26

Les expériences de gel de retardement montrent que le segment A, présent sur les régions 3'UTR II, 3'UTR III et 3'UTR IV de l'ARNm de la calpastatine (figure 5), ne lie pas les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26. Aucune formation de complexe stable n'a été observée lorsque le segment A a été incubé avec l'extrait de protéines totales et l'extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl (Figure 14, A).

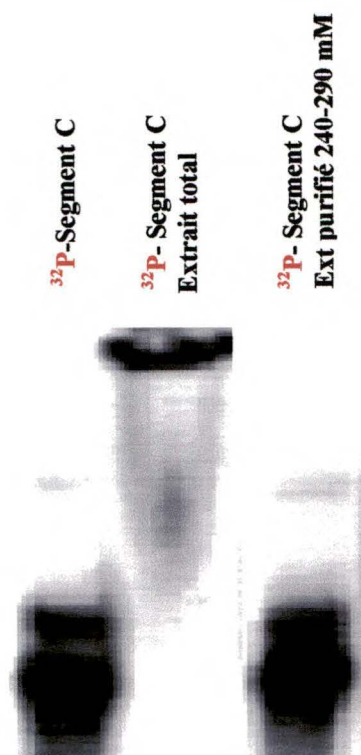
Par ailleurs, les résultats de buvardage de type Northwestern montrent que le segment A lie la protéine CASTRBP84 (présente dans l'extrait de protéines totales). Cependant, cette interaction entre le segment A et la protéine CASTRBP84 montre une affinité beaucoup plus faible que celle de l'interaction entre le segment C et cette même protéine. Les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 (présentes dans l'extrait de protéines totales et l'extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl) possèdent une faible affinité pour le segment A (Figure 14B).

FIGURE 13 INTERACTION DU 3'UTR I (SEGMENT C) AVEC LES PROTÉINES CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 ET CASTRBP26.

(A) Les résultats des expériences de gel de retardement montrent que le segment C des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine interagit avec un ou des facteur(s) présent(s) dans l'extrait de protéines totales. Par ailleurs, aucune interaction n'a été observée dans l'extrait de protéines purifiées 240-290 mM NaCl. Par contre, les expériences de Northwestern.

(B) Les résultats du buvardage northwestern montrent que le segment C interagit fortement avec les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 présentes dans l'extrait de protéines totales et avec les protéines CASTRBP49 et CASTRBP39 présentes dans l'extrait de protéines purifiées 240-290 mM NaCl.

A



Sonde marquée
Segment C

B

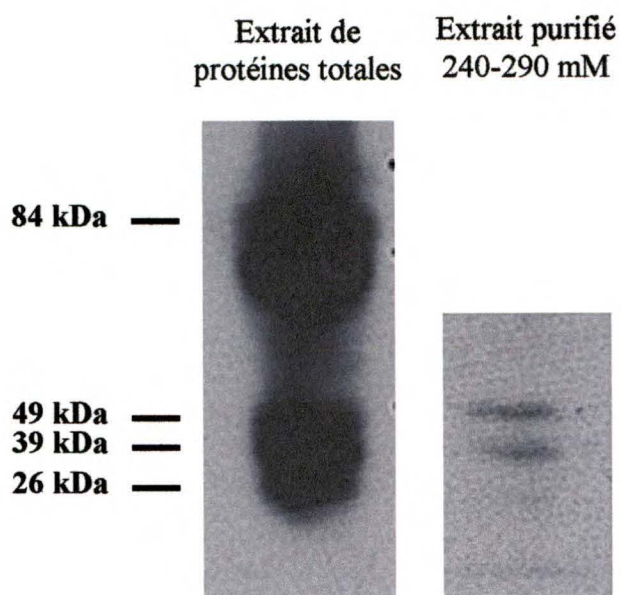


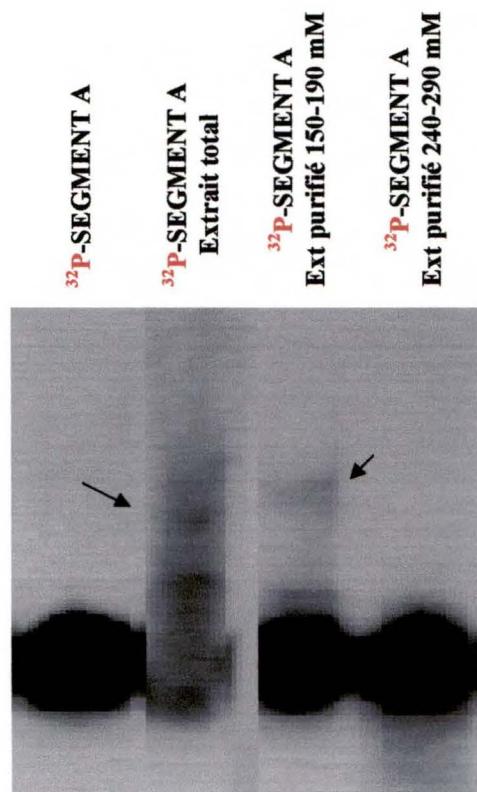
FIGURE 14 INTERACTION DU SEGMENT A DES RÉGIONS 3'UTR II, 3'UTR III ET 3'UTR IV AVEC LES PROTÉINES CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 ET CASTRBP26.

Les interactions entre le segment A des régions 3'UTR II, 3'UTR III et 3'UTR IV et les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 ont été vérifiées par expérience de gel de retardement et par buvardage de type Northwestern.

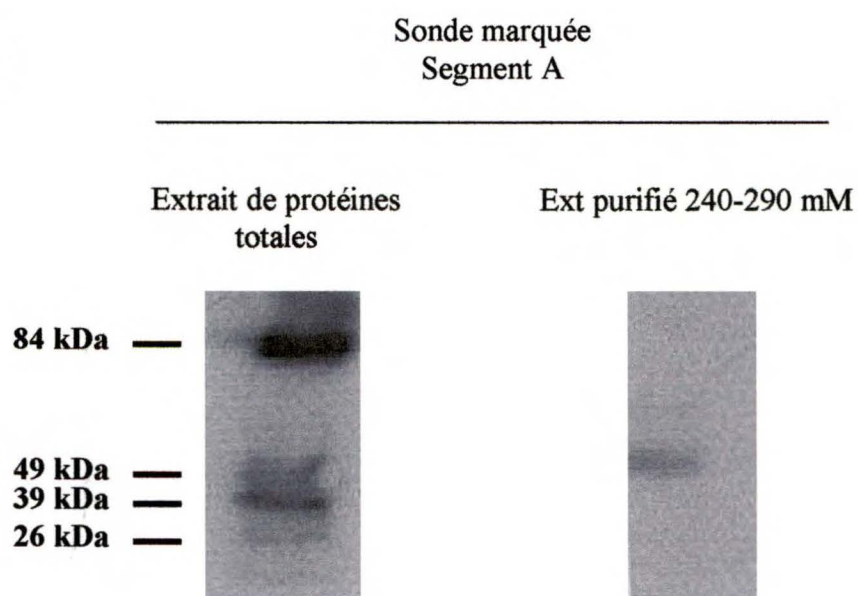
(A) Les résultats de gel de retardement montrent la formation d'un ou de plusieurs complexes instables (les complexes semblent se défaire durant les longues périodes de migration) entre le segment A et des facteurs présents dans l'extrait de protéines totales des cellules HeLa et dans l'extrait de protéines purifiées 150-190 mM NaCl.

(B) Les résultats de Northwestern montrent que le segment A possède une grande affinité pour la protéine CASTRBP84 présente dans l'extrait de protéines totales. Par ailleurs, ce segment possède une faible affinité pour les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 présentes dans l'extrait de protéines totales des cellules HeLa. Seule une faible interaction entre le segment A et la protéine CASTRBP49 a été observée dans l'extrait de protéines purifiées 240-290 mM NaCl.

A



B



3.6.5 Interactions entre le segment B et les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26

Finalement, les résultats des expériences de gel de retardement montrent que le segment B, présent sur les régions 3'UTR III et 3'UTR IV de l'ARNm de la calpastatine (Figure 5), lie fortement une protéine présente dans l'extrait de protéines totales de cellules HeLa et dans l'extrait de protéines semi-purifiées 150-190 mM NaCl. Aucune interaction n'a été observée dans l'extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl (Figure 15A). Les résultats de Northwestern ont montré que seule la protéine CASTRBP84 semble former un complexe avec le segment B. Les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 ne semblent pas lier de façon significative ce segment (Figure 15B).

3.6.6 Présence des protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 dans d'autres lignées cellulaires et la spécificité de leurs interactions avec les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine.

Les résultats des expériences de buvardage de type Northwestern montrent que la région 3'UTR II lie trois protéines présentes dans l'extrait de protéines totales des cellules ECV : une protéine de 80 kDa, une protéine de 49 kDa et une dernière de 39 kDa (Figure 16A). Aussi, cette région 3'UTR lie quatre protéines présentes dans l'extrait de protéines totales des cellules HL60 : une protéine de 84 kDa, une protéine de 80 kDa, une protéine de 49 kDa et une dernière de 39 kDa (Figure 16A). Plus d'expériences seraient nécessaires pour vérifier la possibilité que les protéines de 84 kDa et 80 kDa soient deux isoformes différents de la protéine CASTRBP84.

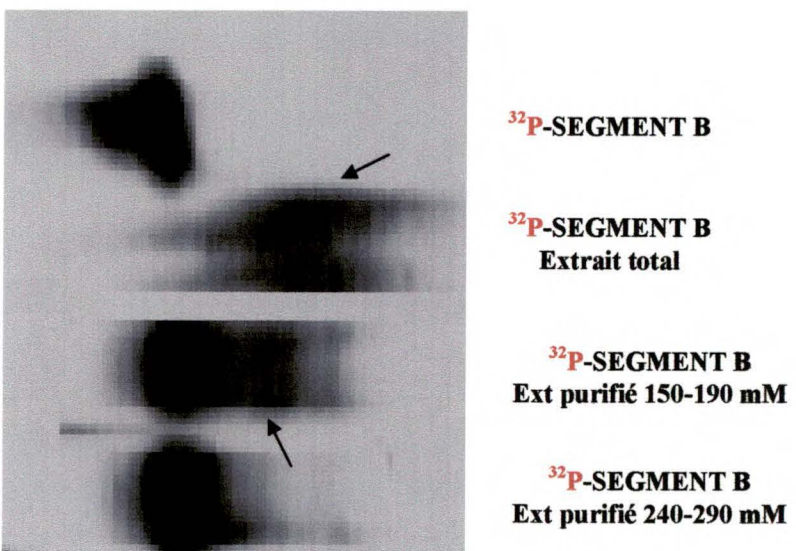
FIGURE 15 INTERACTION DU SEGMENT B DES RÉGIONS 3'UTR III et 3'UTR IV AVEC LES PROTÉINES CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 ET CASTRBP26.

Les interactions entre le segment B des régions 3'UTR III et 3'UTR IV et les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 ont été étudiées par expérience de gel de retardement et par buvardage de type northwestern.

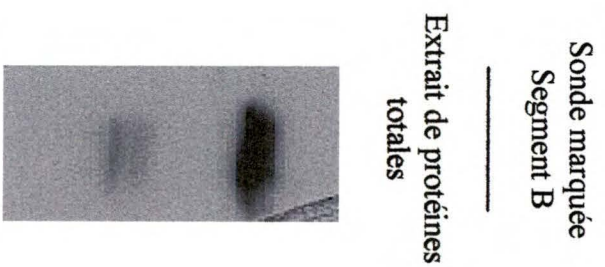
(A) Les résultats de gel de retardement montrent la formation d'un complexe entre le segment B et des facteurs présents dans l'extrait de protéines totales et dans l'extrait de protéines purifiées 150-190 mM NaCl. Aucune interaction significative n'a été observée lorsque le segment B a été incubé en présence de l'extrait de protéines purifiées 240-290 mM NaCl.

(B) Les résultats de Northwestern montrent que le segment B possède une grande affinité pour la protéine CASTRBP84 présente dans l'extrait de protéines totales. Par ailleurs, ce segment interagit faiblement avec les protéines CASTRBP49 et CASTRBP39. Aucune interaction entre le segment B et la protéine CASTRBP26 n'a été observée.

A



B



Les protéines de poids moléculaire de 49 kDa et 39 kDa sont probablement les protéines CASTRBP49 et CASTRBP39 identifiées dans les extrait protéiques des cellules HeLa. Pour vérifier la spécificité des interactions observées entre les régions 3'UTRs de la calpastatine et les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26, nous avons synthétisé un ARN contrôle d'une longueur environ égale à celle de la région 3'UTR II de l'ARNm de la calpastatine. Cet ARN a été utilisé comme ARN témoin dans les expériences de gel de retardement et de buvardage de type Northwestern. Aucune interaction n'a été observée entre l'ARN témoin et les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 (Figure 16B). Ceci démontre la spécificité des interactions observées entre ces protéines et les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine. Cette constatation est renforcée par le fait que toutes les expériences de gel de retardement et de buvardage Northwestern ont été effectuées en présence de fortes concentrations d'ARN compétiteur (ARNt des levures) et d'héparine (empêche les interactions non-spécifiques de type ARN-protéine).

3.6.7 Localisation cellulaire des protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26

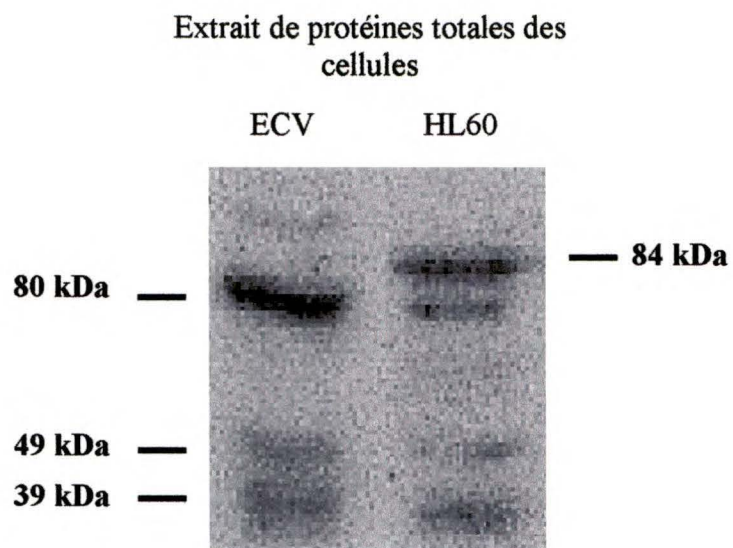
Aucune formation de complexe de type ARN-protéine n'a été observée lorsque les expériences de gel de retardement et de buvardage de type Northwestern ont été effectuées en utilisant la région 3'UTR II et un extrait de protéines nucléaires de cellules

FIGURE 16 EXPÉRIENCES DE BUWARDAGE DE TYPE NORTHWESTERN MONTRANT LA SPÉCIFICITÉ DES INTERACTIONS ENTRE LA RÉGION 3'UTR II ET LES PROTÉINES CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 ET CASTRBP26 ET LA PRÉSENCE DE CES PROTÉINES DANS D'AUTRES LIGNÉES CELLULAIRES

(A) Des membranes de nylon sur lesquelles ont transférés des extraits de protéines totales des cellules ECV et HL60 ont été incubées en présence de la région 3'UTR II de la calpastatine marquée au ^{32}P pour y vérifier la présence des protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26. La protéine CASTRBP84 ainsi qu'une autre protéine de poids moléculaires de 80 kDa ont été observées dans l'extrait de protéines totales des cellules HL60. Alors que seule la protéine de poids moléculaire de 80 kDa est présente dans l'extrait de protéines totales des cellules ECV. Les protéines CASTRBP49 et CASTRBP39 sont présentes dans les deux extraits tandis que la protéine CASTRBP26 est absente dans les deux extraits.

(B) La spécificité des interactions observées entre les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26, et la région 3'UTR II a été démontrée par des expériences de buvardage de type northwestern en utilisant un ARN contrôle correspondant à une région de l'ARNm de la PR3 (protéinase 3), ayant la même longueur que la région 3'UTR II. L'ARN contrôle ne montre pas d'interaction avec les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.

A



B

Extrait de protéines totales de
cellules HeLa
³²P-PR3



HeLa (Figure 17). Ceci semble indiquer que les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 seraient cytoplasmiques. Cependant nous ne disposons pas d'un contrôle positif (ARN montrant une interaction avec un facteur nucléaire) ou d'un extrait cytoplasmique pour conclure que ces protéines soient cytoplasmiques.

3.7 Production de la protéine La recombinante par le système pGEX4T-1

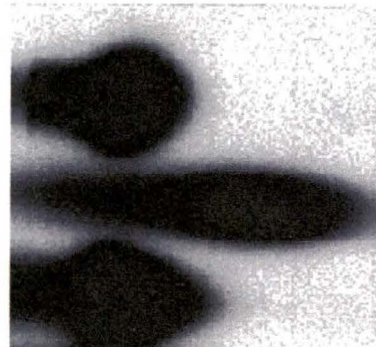
Pour identifier les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26, nous avons vérifié dans les banques de données de protéines et dans la littérature s'il existe des protéines de liaison de l'ARN (RNA-binding proteins), qui ont les mêmes poids moléculaire que les protéines que nous avons identifiées, et qui sont impliquées dans des mécanismes de régulation post-transcriptionnels. Aucun candidat potentiel n'a été identifié pour la protéine CASTRBP84. Par contre, plusieurs observations nous ont permis de suggérer que les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 pourraient représenter les trois formes connues de la protéine La. En effet, la protéine La, de poids moléculaire d'environ 49 kDa, est connue pour sa grande susceptibilité à la protéolyse suite à plusieurs phases de gel et de dégel, donnant ainsi naissance à deux isoformes de protéolyses de 39kDa et 26 kDa (Heise et al, 1999). De plus, la protéine La est connue pour sa capacité à lier des ARN, tel que l'ARN hY5, même dans les conditions dénaturantes du buvardage Northwestern (Brière et al, travaux en cours).

Nous avons remarqué, dans nos expériences de Northwestern, que seulement la protéine CASTRBP49 est liée par la région 3'UTR II lorsque l'extrait de protéines totales de cellules HeLa et l'extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl n'ont subi qu'une seule phase de gel et de dégel. Ce n'est que après deux ou trois phases de gel et de

FIGURE 17 LOCALISATION CELLULAIRE DES PROTÉINES CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 ET CASTRBP26 DÉTERMINÉE PAR EXPÉRIENCE DE GEL DE RETARDEMENT ET PAR BUVARDAGE DE TYPE NORTHWESTERN

Un extrait de protéines nucléaires a été utilisé dans des expériences de gel de retardement et buvardage de type northwestern pour y vérifier la présence des protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26. Aucune interaction de type 3'UTR II-protéine n'a été observée par expérience de gel de retardement (A), ni par buvardage de type Northwestern (B).

A



³²P-3'UTR II

³²P-3'UTR II

Ext de protéines totales

³²P-3'UTR II

Ext de protéines nucléaires

B



³²P-3'UTR II

Ext de protéines nucléaires

dégel des extraits utilisés que la région 3'UTR II reconnaît et lie les protéines CASTRBP39 et CASTRBP26. De plus, l'utilisation d'un sérum humain contenant des anticorps anti-La dans des expériences de buvardage Western montre que la protéine La est présente dans l'extrait de protéines totales et l'extrait de protéines semi-purifiées 240-290 mM NaCl dans lesquels la protéine CASTRBP49 a été identifiée par Northwestern (figure 18).

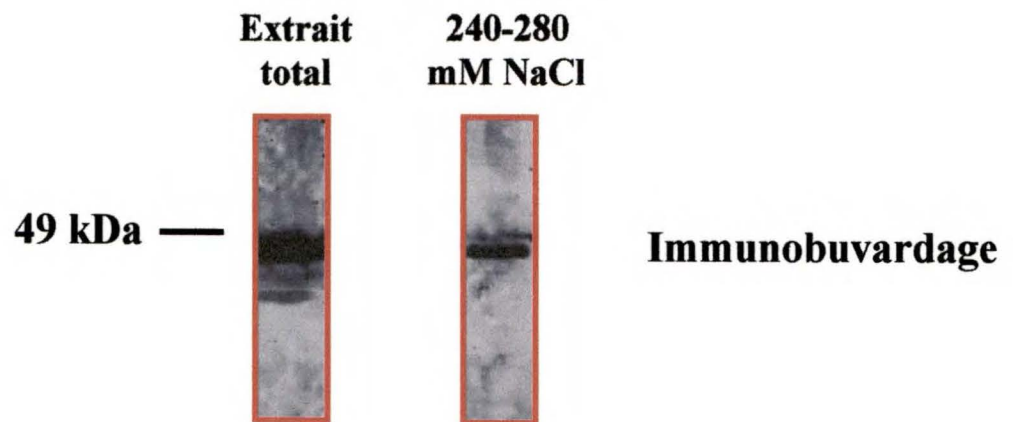
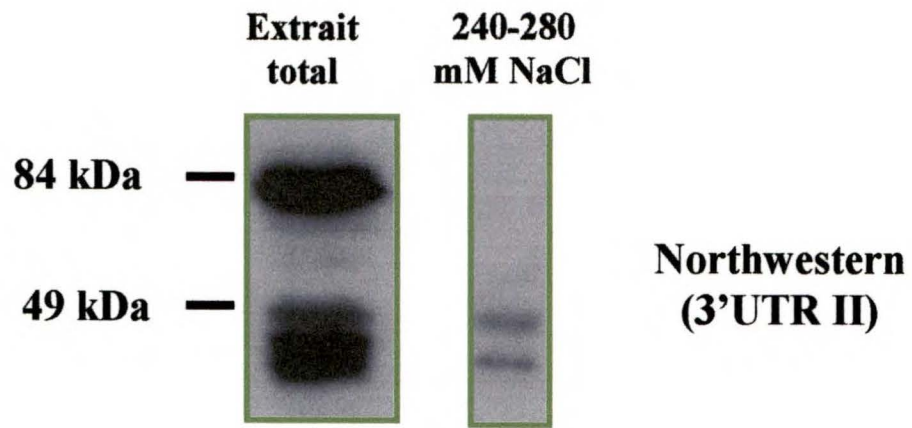
En plus de lier les transcrits de l'ARN polymérase III, la protéine La est connue pour son rôle dans certains mécanismes de régulation post-transcriptionnelle des ARNms tel que, la stabilisation de l'ARNm de l'histone (MacLaren et al., 1997) et l'initiation de la traduction d'autres ARNms (MacLaren et al., 1997). La protéine La semble ainsi avoir un large spectre de spécificité quand à la liaison des ARNs, et il serait possible alors, que les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 puissent représenter les trois formes de la protéines La.

Pour vérifier cette possibilité nous avons procédé à l'expression de la protéine La recombinante en utilisant le système d'expression pGEX4T-1. Les protéines de fusion GST-La (figure 19, piste 2) ont été purifiées et clivées à l'aide de la thrombine pour produire un extrait purifié de protéine La recombinant.

Nous avons remarqué que la protéine La recombinante purifiée de poids moléculaire de 49 kDa (Figure 19, piste 3) subit elle aussi une protéolyse suite à quelques phases de gel et de dégel, donnant ainsi naissance à deux nouvelles formes d'environ 39 et 26 kDa (Figure 19, piste 4).

FIGURE 18 EXPÉRIENCES DE BUVARDAGE DE TYPE NORTHWESTERN ET WESTERN BLOT.

Un sérum humain anti-La a été utilisé, en buvardage de type western, pour vérifier la présence de la protéine La dans l'extrait de protéines totales et de protéines semi-purifiées 240-280 mM NaCl où les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 ont été observées par northwestern. La protéine La est présente dans les deux extraits, et elle présente un poids moléculaire de 49 kDa identique à celui de la protéine CASTRBP49.



La protéine La recombinante purifiée a été utilisée dans des expériences de gel de retardement et de buvardage de type Northwestern dans le but de vérifier sa capacité à lier la région 3'UTR II.

3.8 Interaction de la protéine La avec les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine

20 µg de protéine La recombinante a été utilisée dans des expériences de gel de retardement et de buvardage Northwestern, dans le but de vérifier son interaction avec la région 3'UTR II de l'ARNm de la calpastatine. La quantité de protéine La utilisée est largement supérieure à la quantité de protéine La endogène présente dans l'extrait de protéines totales de cellules HeLa puisque 20 µg de ce dernier été suffisant pour observer les interactions entre les protéines la région 3'UTR II et les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.

Aucune interaction entre la protéine La recombinante et la région 3'UTR II n'a été observée par expérience de gel de retardement (Figure 20 A). Par ailleurs, les résultats des expériences de buvardage Northwestern montrent que la région 3'UTR II semble lier la protéine La recombinante (Figure 20 B). Cette interaction semble être faible puisqu'elle a nécessité une durée d'exposition des membranes de Northwestern cinq fois plus longue que la durée d'exposition nécessaire pour observer l'interaction entre la région 3'UTR II et les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 présentes dans l'extrait de protéines totales de cellules HeLa.

FIGURE 19 EXPRESSION DE LA PROTÉINE La RECOMBINANTE

Des bactéries PR745 *lon*⁻ ont été transformées par le vecteur pGEX4T-1 dans lequel l'ADNc de la protéine La a été cloné. L'expression de la protéine de fusion GST-La a été induite par l'IPTG (piste 2). La piste 1 montre le contrôle d'extrait de bactéries non stimulées à l'IPTG. Les protéines de fusions GST-La ont été purifiées et clivées à l'aide de la thrombine pour obtenir un extrait de protéine La purifiée (piste 3). La protéine La est connue pour sa sensibilité à la protéolyse suite à plusieurs phases de gels et de dégels, donnant naissance ainsi à deux isoformes de clivages (39 et 26 kDa) (piste 4).

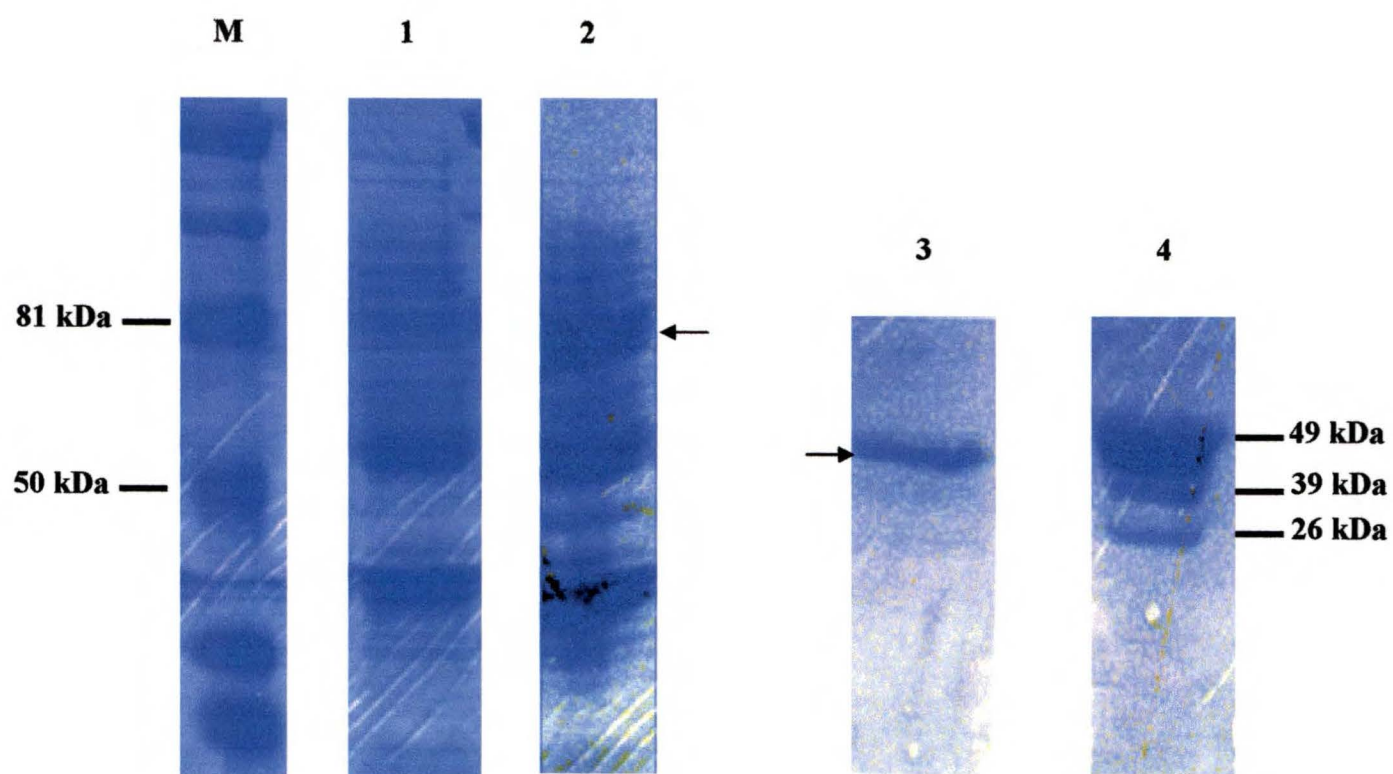


FIGURE 20 INTERACTION ENTRE LE 3'UTR II DE L'ARN_m DE LA CALPASTATINE ET LA PROTÉINE La RECOMBINANTE

Dans le but de vérifier l'interaction de la région 3'UTR II avec la protéine La, nous avons procédé à des expériences de gel de retardement et de buvardage de type Northwestern.

(A) Les résultats des expériences de gel de retardement montrent que la protéine La recombinante n'interagit pas avec la région 3'UTR II.

(B) Expériences de buvardage Northwestern : la région 3'UTR II semble interagir avec la protéine La recombinante (piste 1 : 5 µg de protéine La, piste 2 : 10 µg de protéine La et piste 3 : 20 µg de protéine La). Cependant, cette interaction semble être faible puisqu'elle a nécessité une durée du temps d'exposition des membranes cinq fois plus longue que la durée du temps d'exposition nécessaire pour observer l'interaction entre la région 3'UTR II et les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 présentes dans l'extrait de protéines totales.

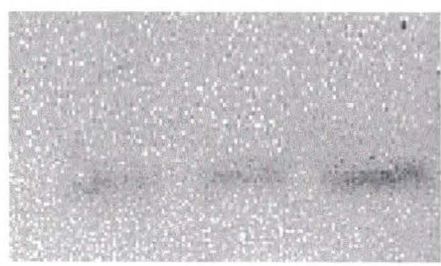
A

³²P-3'UTR II
³²P-3'UTR II
protéine La



B

1 2 3



4.0 Discussion

Dans cette étude nous avons tenté de déterminer l'étendue de la diversité et l'organisation des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine. Par technique de RT-PCR et de 3'RACE, nous avons réussi à isoler deux nouvelles régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine. Les séquences des ARNms de la calpastatine de l'humain, du porc, du bœuf, du mouton, du lapin et du rat ont été alignées dans le but d'établir le degré de conservation des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine chez toutes ces espèces. Les prédictions de structures secondaires de ces régions 3'UTRs nous ont permis d'identifier des éléments structuraux homologues (éléments *Cis*) présents sur les ARNms de la calpastatine des espèces mentionnées. Aussi, nous avons essayé de déterminer si la grande diversité des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine humaine jouerait un rôle dans le contrôle de la stabilité des différents transcrits de la calpastatine.

Il est bien connu que les régions 3'UTRs des ARNms eucaryotes ont souvent des rôles important dans les mécanismes de régulation post-transcriptionnels. Ces derniers nécessitent souvent des interactions de type ARN-protéine impliquant ces régions. Nous avons donc procédé à des expériences de gel de retardement et de buvardage Northwestern afin de déterminer si les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine sont impliquées dans des interactions de type ARN-protéine avec des facteurs protéiques cellulaires (facteurs *Trans*).

Diversité et organisation des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine humaine et d'autres espèces

Nous avons auparavant démontré que les ARNms de la calpastatine peuvent posséder quatre régions 3'UTRs différentes (El-Amine et al, en préparation). Les régions 3'UTR II, 3'UTR III, 3'UTR V et 3'UTR VI sont d'une longueur de 470, 617, 711 et 531 pb respectivement. Toutes ces régions possèdent une région homologue d'une longueur de 273 pb, nommée segment C, située directement après le codon stop (Figure 5, B). Les séquences qui suivent le segment C départagent la région 3'UTR de l'ARNm de la calpastatine en quatre types différents. Ainsi, le 3'UTR II est constitué de deux segments différents; le segment C et le segment A, tandis que le 3'UTR III est constitué des segments C, A et B. Par ailleurs, le 3'UTR V semble être d'une classe à part puisqu'il est constitué des segments C, X et Z. Enfin, le 3'UTR VI, retrouvé sur l'isoforme de l'ARNm de la calpastatine spécifique au testicule humain, est constitué du segment C, de deux répétitions des dernières séquences du segment C, de deux segments X et du segment T.

Dans cette étude nous avons vérifié la possibilité de l'existence d'autres régions 3'UTR de l'ARNm de la calpastatine. Pour cela, nous avons effectué des expériences de 3'RACE en utilisant l'ARNm des cellules HeLa. Ceci nous a permis d'identifier une nouvelle région 3'UTR de la calpastatine. Cette région, constituée du segment C seulement, est d'une longueur de 273 pb. Elle représente ainsi la région 3'UTR la plus courte que l'ARNm de la calpastatine peut posséder. Nous avons nommé cette région le 3'UTR I (Figure 5, B).

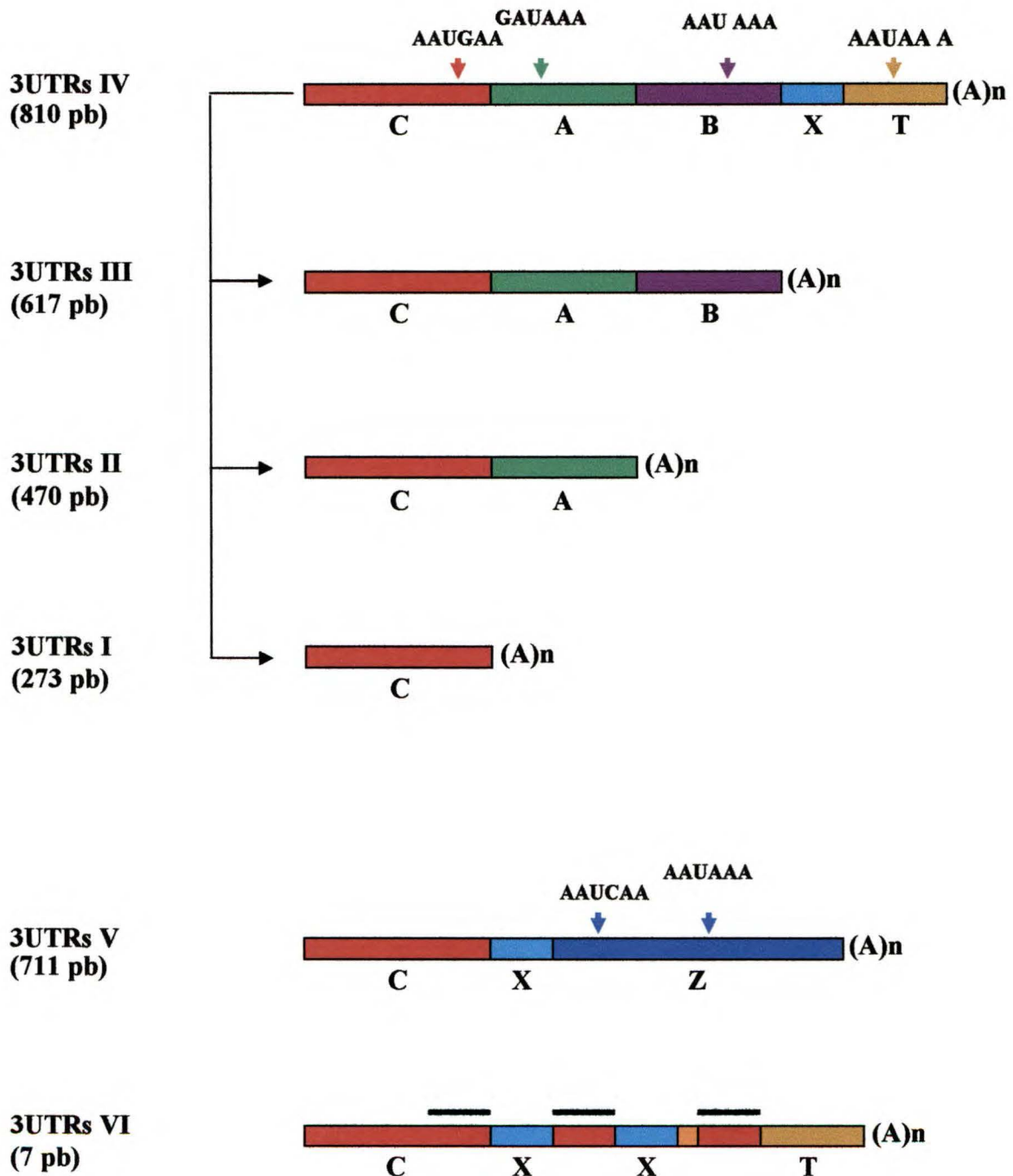
Par ailleurs, en essayant d'amplifier la région 3'UTR VI à partir de l'ARNm du testicule humain, nous avons isolé une nouvelle région 3'UTR d'une longueur de 810 pb. Cette dernière est constituée des segments C, A, B, X et T. Nous avons nommé cette région le 3'UTR IV.

Ainsi, les ARNms de la calpastatine peuvent posséder jusqu'à six différentes régions 3'UTRs allant d'une longueur de 273 pb à 810 pb. Deux mécanismes peuvent être responsables de cette diversité des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine : l'épissage alternatif et/ou une sélection alternative des signaux de polyadénylation. Il est bien connu que l'épissage alternatif est responsable de la diversité qui touche les régions codantes de l'ARNm de la calpastatine (Lee et al., 1992, De Tello et al., 1998). Il est donc possible que les mécanismes d'épissage alternatif affectent les régions 3' non codantes de l'ARNm de la calpastatine, résultant ainsi, en la formation de plusieurs régions 3'UTRs différentes. Ceci a déjà été décrit auparavant pour un autre ARNm (Sureau et al., 1994).

Par ailleurs, il est bien connu qu'un mécanisme de sélection alternative des signaux de polyadénylation peut entraîner la formation de différentes régions 3'UTRs pour un même ARNm (Manley et al., 1997). La région 3'UTR initiale présente sur le préARNm peut contenir plusieurs signaux de polyadénylation. Une régulation différentielle du choix de ces signaux peut résulter en la formation de différentes régions 3'UTRs de longueur différentes. Différents signaux de polyadénylation, conservés et non-conservés (Manley et al., 1997), sont présents dans les différents segments des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine (Figure 21). Ces signaux pourraient probablement être impliqués dans les mécanismes responsables de la formation des régions 3'UTR I, 3'UTR II, 3'UTR III,

FIGURE 21 LES SIGNAUX DE POLYADÉNYLATION PRÉSENTS SUR LES RÉGIONS 3'UTRs DE L'ARNm DE LA CALPASTATINE.

Différents signaux de polyadénylation sont présents dans les segments qui constituent les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine. Ainsi, la diversité des régions 3'UTRs de la calpastatine pourraient être due à un mécanisme de sélection alternative des signaux de polyadénylation combiné à des mécanismes d'épissage alternatif.



3'UTR IV. Cependant, il est très probable que seul un mécanisme d'épissage alternatif pourrait être responsable de la formation des régions 3'UTR V et 3'UTR VI puisqu'il est clair qu'un remaniement des différents segments est nécessaire pour leur formation.

Le séquençage du gène de la calpastatine pourrait donner les indices nécessaires pour identifier les mécanismes derrière la diversité des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine.

Les 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine chez d'autres espèces

Les régions 3'UTRs, de certains ARNms, jouent un rôle important dans les mécanismes de la régulation post-transcriptionnelle. Aussi, les fonctions et les séquences des régions 3'UTRs, de certains ARNm, semblent parfois être conservées chez plusieurs espèces (Zehner et al., 1997). L'analyse comparative des séquences des ARNms de la calpastatine de l'humain, du porc, du bœuf, du mouton, du lapin et du rat (disponible dans la banque de donnée GenBank) nous a permis de constater la présence des régions 3'UTRs sur l'ARNm de la calpastatine chez toutes ces espèces. Le tableau II montre les pourcentages d'homologies entre les différents segments des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine humaine et les régions 3'UTRs des ARNms de la calpastatine du porc, du bœuf, du mouton, du lapin et du rat. Les régions 3'UTRs des ARNms de la calpastatine de toutes ces espèces contiennent le segment C, observé au niveau des régions 3'UTRs de la calpastatine humaine, avec un pourcentage d'homologie allant de 79 à 90 %. Le segment A est aussi présent dans les régions 3'UTRs des ARNms de la calpastatine du porc, du bœuf et du lapin avec un pourcentage d'homologie de 92%. Le segment B a été

retrouvé dans les régions 3'UTRs du porc, du bœuf et du lapin avec un pourcentage d'homologie de 82 à 85 %.

Les séquences des ARNm de la calpastatine de ces espèces animales, publiées dans la banque de données GenBank, ne sont pas complètes et ne sont pas aussi nombreuses que les séquences d'ARNms de la calpastatine humaine. Ainsi, nous n'avons pas observé la présence des segments Z et T au niveau des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine du porc, du bœuf, du mouton, du lapin et du rat. Les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine sont plus conservées que les régions codantes (tableau II). Ceci suggère qu'ils auraient une fonction conservée chez les différentes espèces animales.

Prédictions des structures secondaires des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine

Il est bien connu que la majorité des mécanismes impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle nécessitent des interactions de type ARN-protéine, entre des protéines de liaison de l'ARN (facteurs *Trans*) et des éléments structuraux de l'ARNm (éléments *Cis*) tels que les structures en tige-boucle "stem-loop" (Siomi et al., 1997).

Dans le but de vérifier si les homologies de séquences entre les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine de l'humain, du porc, du bœuf, du mouton, du lapin et du rat résulteraient en des homologies de structures, nous avons établi les prédictions des structures secondaires de toutes ces régions 3'UTRs. Ainsi, nous avons observé deux structures, de type tige-boucle, qui sont conservées dans les régions 3'UTRs de l'ARNm de toutes ces espèces (Figure 7). La tige-boucle C est localisée dans le segment C, tandis

que la tige-boucle A est localisée dans le segment A des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine. Ces structures pourraient jouer un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm de la calpastatine, en moyen d'interactions avec des facteurs protéiques cellulaires.

Diversité des régions des transcrits de la calpastatine

Plusieurs études ont démontré que la calpastatine subit une régulation post-transcriptionnelle au niveau de l'épissage, donnant lieu à une multitude de transcrits (Lee et al., 1992). En effet, la calpastatine érythrocytaire et la calpastatine testiculaire ne possèdent que les trois domaines inhibiteurs 2, 3 et 4 et leurs manquent, ainsi, les domaines L et 1. L'isoforme testiculaire possède, en plus, une nouvelle région de 65 acides aminés située avant le domaine 2. Par ailleurs, des études récentes montrent qu'il existe, au niveau du cerveau du rat, quatre différents isoformes de l'ARNm de la calpastatine. Étonnement, un de ces quatre transcrits n'est composé que des domaines codant L et 1, alors qu'un autre transcrit n'est composé que du domaine codant L seulement. Ce dernier ne possède donc aucune activité inhibitrice de la calpaïne (De Tellio et al., 1998). Toutes ces études se sont intéressées aux régions codantes seulement et ne donnent aucune information sur la composition des transcrits de la calpastatine en régions 3'UTRs.

Des expériences de buvardage de type Northern effectuées au laboratoire par El-Amine et al., en préparation, ont montré qu'il existe deux transcrits ubiquiste majeurs de la calpastatine dans différents tissus humains : un transcrit d'une taille de 4.9 kb et un autre

d'une taille de 3.3 kb. Il a aussi confirmé la présence d'un transcrit d'une taille de 1.8 kb spécifique au testicule humain.

En modifiant les conditions du buvardage de type Northern, nous avons pu montrer la présence, dans plusieurs lignées cellulaires, d'un nouveau transcrit ayant une taille d'environ 1 kb (Figure 8). Ce transcrit a été détecté à l'aide d'une sonde correspondant au domaine 4 codant. On ignore encore la composition en domaines codants et en régions 3'UTRs de ce nouveau transcrit. Des études plus exhaustives par technique de RT-PCR seraient nécessaires pour vérifier les structures primaires de tous les différents transcrits de la calpastatine.

L'existence de six différentes régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine vient augmenter la complexité des études concernant la régulation post-transcriptionnelle de ce dernier. En effet, certains tissus, tel que le placenta humain, ne contiennent que trois isoformes de l'ARNm de la calpastatine. Alors, si chacun de ces trois transcrits peut posséder six régions 3'UTRs différentes, le nombre des différents transcrits de la calpastatine qui existeraient simultanément dans la cellule s'élèverait à dix-huit. De plus, certains tissus semblent contenir plus que trois isoformes de l'ARNm de la calpastatine. Tel est le cas du cœur humain qui contient six différents isoformes de l'ARNm de la calpastatine allant de 2.2 à 4.9 kb (El-Amine et al., en préparation). Toutes ces données suggèrent que le préARNm de la calpastatine subit des processus d'épissage très complexes qui affecteraient les régions 5'UTRs (Lee et al., 1992), les régions codantes (Lee et al., 1992, De Tellio et al., 1998) et les régions 3'UTRs.

Le clonage et le séquençage du gène de la calpastatine donneraient certainement plus d'information sur les processus d'épissage et les mécanismes de leur régulation responsables de cette diversité des transcrits de la calpastatine.

Études de stabilité des ARNms de la calpastatine

Les expériences de buvardage de type Northern nous ont permis de déterminer que les demi-vies des deux transcrits ubiquistes de 4.9 kb et de 3.3 kb étaient semblables et qu'elles étaient d'environ 5 heures (Figure 9, A). Par ailleurs, en amplifiant le domaine 4 par RT-PCR, la demi-vie calculée était d'environ 8 heures et demie (Figure 9, B et Figure 10). Ceci pourrait être expliqué par le fait que contrairement à la technique de buvardage Northern, la technique de RT-PCR ne permet pas de distinguer entre les différents transcrits de la calpastatine (4.9, 3.3 et 1 kb). Ainsi, le domaine 4 amplifié proviendrait de plusieurs transcrits différents, affectant ainsi la demi-vie observée.

La stabilité des transcrits de la calpastatine est affectée par des facteurs protéiques cellulaires. L'inhibition de la traduction, en pré-incubant les cellules en présence de cycloheximide (inhibiteur de la traduction), augmente la demi-vie des transcrits ubiquistes qui atteint une valeur d'à peu près 8 heures (observée par technique de buvardage Northern) (Figure 9 A). Ceci veut dire qu'en temps normal, la cellule produit des facteurs protéiques qui jouent un rôle de déstabilisation de l'ARNm de la calpastatine. Ces facteurs semblent avoir le même effet sur tous les différents isoformes de l'ARNm de la calpastatine.

Les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine ne semblent pas affecter sa demi-vie. En effet, les expériences de RT-PCR montrent que tous les transcrits de la calpastatine ont des demi-vies semblables peu importe la région 3'UTR qu'ils possèdent.

Les différents transcrits de la calpastatine varient selon leur composition en domaines codants et en région 3'UTRs ce qui rend difficile le choix des sondes utilisées dans les études de stabilité par buvardage northern blot. L'utilisation de gènes chimériques constitués d'un gène contrôle, tel que la β -actine auquel seraient ligués les différentes régions 3'UTRs de la calpastatine, pourrait nous permettre de déterminer de façon plus précise l'influence des régions 3'UTRs sur la stabilité des ARNms de la calpastatine.

Interactions de certaines protéines cytoplasmiques avec les régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine

Les interactions de type ARN-protéine jouent un rôle important dans les processus de régulation post-transcriptionnels des ARNms eucaryotes tel que le contrôle de leur stabilité, leur traduction et leur localisation cellulaire. La grande diversité des régions 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine, leur haut degré de conservation chez différentes espèces ainsi que la conservation de deux structures en tige-boucle dans les régions 3'UTRs de plusieurs espèces suggèrent un rôle probable de ces régions dans des mécanismes de régulation post-transcriptionnels. Ainsi, il est possible que ces régions soient impliquées dans des interactions de type ARN-protéine avec des protéines cytoplasmiques ou nucléaires.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons procédé à des expériences de gel de retardement et de buvardage de type Northwestern. Ces deux types d'expériences présentent chacune des avantages et des désavantages.

Les expériences de gel de retardement peuvent fournir des informations sur la formation de complexes ARN-protéines ainsi que sur leur stabilité ou leur affinité. En effet, les complexes formés subissent une migration sur un gel d'acrylamide à 120-180 V durant des périodes de 5 à 8 heures. Des fortes interactions entre l'ARN et les protéines sont nécessaires afin d'assurer la stabilité des complexes dans ces conditions. Par contre, ces expériences ne peuvent pas nous indiquer le nombre exacte et les tailles des protéines impliquées dans les interactions observées.

Les expériences de buvardage Northwestern peuvent fournir des informations additionnelles sur les complexes ARN-protéines observés par expériences de gel de retardement. Contrairement à l'expérience de gel de retardement qui se déroule dans des conditions non dénaturantes, l'expérience de buvardage Northwestern nécessite le passage par une étape de dénaturation (SDS-PAGE). Ainsi, cette dernière technique peut nous informer seulement sur les tailles et le nombres des protéines qui interagissent directement avec les régions 3'UTRs de la calpastatine.

Les ARNs correspondants à la région 3'UTR II, le segment C, le segment A et le segment B (Figure 5) ont été synthétisés par transcription in vitro et utilisés dans des expériences de gel de retardement et de buvardage Northwestern.

Quatre protéines montrant des interactions avec ces différents ARNs ont été identifiées. Ces protéines que nous avons nommé CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39, CASTRBP26 ont des poids moléculaires de 84, 49, 39 et 26 kDa, respectivement.

Les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 montrent des interactions très fortes avec la région 3'UTR II (formé du segment C et du segment A). Ces interactions ont été observées par expérience de gel de retardement et par buvardage Northwestern (Figure 12 A et B).

Seule une seule interaction a été observée par expériences de gel de retardement lorsque le segment C (commun à toutes les régions 3'UTRs) a été utilisé. Cette interaction est probablement due à la formation du complexe CASTRBP84-segment C. Par contre, les expériences de buvardage northwestern montrent que les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26, présentes dans l'extrait de protéines totales, interagissent fortement avec l'ARN correspondant au segment C (Figure 13 A et B).

Les expériences de gel de retardement montrent que les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 ne lient pas l'ARN correspondant au segment A. Les expériences de Northwestern confirment cette constatation puisque ce segment montre des interactions, avec les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26, plus faible que celles observées avec le segment C (Figure 14 A et B).

Les expériences de gel de retardement montrent que l'ARN correspondant au segment B (présent dans les régions 3'UTR III et 3'UTR IV) interagit avec une protéine présente dans l'extrait de protéines totales. Les résultats des expériences de buvardage Northwestern montrent que cet ARN interagit avec la protéine CASTRBP84 et très faiblement avec les protéines CASTRBP49 et CASTRBP39 (figure 15 A et B).

La spécificité des interactions observées entre les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 et les ARNs correspondants au 3'UTR II, segment C,

segment A et segment B a été démontrée en utilisant un ARN témoin (correspondant à 400 pb de l'ARNm de la protéinase 3). En effet, l'ARN témoin ne montre aucune interaction avec les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 (Figure 16 B).

Des études supplémentaires seront nécessaires pour identifier les sites de liaison des protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26. Les expériences de Northwestern montrent que les différents segments utilisés lient les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26. Ceci peut être expliqué par le fait que ces protéines reconnaissent des séquences spécifiques qui pourrait être répétées tout le long des régions 3'UTRs. L'analyse des séquences 3'UTRs de l'ARNm de la calpastatine nous a permis d'identifier plusieurs séquences riches en AU présentes au niveau des différents segments de ces régions non traduites. De plus, les différentes régions 3'UTRs de la calpastatine sont riches en structures secondaires de type tige-boucle qui pourraient être impliquées dans les interactions observées.

Les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 semblent être des protéines cytoplasmiques. Les complexes 3'UTR-protéines observés par expérience gels de retardement et de buvardage Northwestern en utilisant des extraits de protéines totales n'ont pas été observés lorsque ces expériences ont été répétées en utilisant un extrait de protéines nucléaires (Figure 17). Seule l'utilisation d'un extrait cytoplasmique pourrait nous permettre de conclure quant à la localisation cellulaire de ces protéines.

Finalement, les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 sont présentes dans d'autres lignées cellulaires. En effet, les résultats des expériences de buvardage de type Northwestern montrent que la région 3'UTR II lie trois protéines présentes dans l'extrait

de protéines totales des cellules endothéliales (ECV) : une protéine de 80 kDa, une protéine de 49 kDa et une dernière de 39 kDa (Figure 17, A). Aussi, cette région 3'UTR lie quatre protéines présentes dans l'extrait de protéines totales des cellules HL60 : une protéine de 84 kDa, une protéine de 80 kDa, une protéine de 49 kDa et une dernière de 39 kDa (Figure 17 A). La possibilité que les protéines de 84 kDa et 80 kDa soient deux formes différentes de la protéine CASTRBP84 ou deux protéines non apparentées reste à vérifier. Les protéines de poids moléculaire de 49 kDa et 39 kDa sont probablement les protéines CASTRBP49 et CASTRBP39 identifiées dans les extraits protéiques des cellules HeLa.

Malgré toutes les informations tirées des expériences de Northwestern nous ne pouvons pas affirmer que les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 sont les seules protéines impliquées dans la formation des complexes ARN-protéine observés par expériences de gels de retardement. En effet, il est possible que d'autres protéines ayant des interactions avec les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26, sans être impliquées dans des interactions de type ARN-protéines avec les régions 3'UTRs de la calpastatine, participent à la formation des complexes observés par expériences de gels de retardement.

Les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 représentent-elles les trois formes connues de la protéine La ?

Nous avons vérifié dans les banques de données des protéines s'il existe des protéines cytoplasmiques dont les poids moléculaires correspondaient aux poids moléculaires des protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26, et qui seraient

connues pour leur activité de liaison de l'ARN. Aucun candidat potentiel n'a été identifié pour la protéine CASTRBP84. Cependant, plusieurs observations nous ont permis de suggérer que les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 puissent représenter les trois formes connues de la protéine La. En effet, la protéine La, de poids moléculaire de 49kDa, est connue pour sa grande susceptibilité à la protéolyse suite à plusieurs phases de gels et de dégels des extraits protéiques, donnant ainsi naissance à deux isoformes de protéolyses de 39kDa et 26 kDa (Heise et al., 1999). De plus, l'utilisation d'un sérum humain contenant des anticorps anti-La dans des expériences de buvardage Western montre que la protéine La est présente dans l'extrait de protéines totales et l'extrait de protéines purifiées 240-290 mM NaCl dans lesquels les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 ont été identifiées par Northwestern (Figure 18).

Pour vérifier cette hypothèse nous avons procédé à l'expression de la protéine La recombinante afin de l'utiliser dans des expériences de gel de retardement et de buvardage Northwestern (Figure 19).

Les résultats des expériences de gel de retardement montrent que la protéine La recombinante ne lie pas la région 3'UTR II. Cependant les expériences de buvardage northwestern montrent que la région 3'UTR II semble interagir, très faiblement avec la protéine La recombinante (Figure 20). Cette interaction semble être très faible puisqu'elle a nécessité une durée du temps d'exposition des membranes cinq fois plus longue que la durée du temps d'exposition nécessaire pour observer l'interaction entre la région 3'UTR II et les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 présentes dans l'extrait de protéines totales. La quantité de protéine La recombinante utilisée dans ces expériences

(jusqu'à 20 µg) est considérablement plus élevée que la quantité de protéine La endogène présente dans les extraits de protéines totales de cellules HeLa puisqu'une quantité de 20 µg d'extrait de protéines totales était suffisante pour observer des interactions entre les régions 3'UTRs de la calpastatine et les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26.

Il est connu que l'état de phosphorylation de la protéine La influence sa capacité à lier certains ARNs (Heise et al., 1999). La protéine La recombinante que nous avons produite était probablement sous forme non-phosphorylée. Il serait donc important de répéter les expériences de gel de retardement et de buvardage Northwestern en utilisant la protéine La recombinante phosphorylée *in vitro*.

5.0 Conclusion

L'ARNm de la calpastatine est représenté par plusieurs isoformes ubiquiste et histospécifiques. Il est bien connu que l'épissage alternatif est responsable de la diversité qui touche les régions codantes de l'ARNm de la calpastatine (Lee et al., 1992, De Tello et al., 1998). Les résultats présentés ici montrent que les transcrits de la calpastatine peuvent posséder six régions 3'UTRs différentes que nous avons isolé et nommé 3'UTR I à VI. Toutes ces régions 3'UTRs sont constituées d'un segment C, d'une taille de 273 pb, situé immédiatement après le codon stop. Ce segment est alors suivi de plusieurs segments dont le nombre et la longueur varient selon les différentes régions 3'UTRs. Les transcrits de la calpastatine chez d'autres espèces animales possèdent eux aussi des régions 3'UTRs qui montrent la même organisation (segment C suivie par d'autres segments) que celle retrouvée chez l'humain. De plus, les régions 3'UTRs des transcrits de la calpastatine humaine et d'autres espèces montrent des homologies allant jusqu'à 92 %. L'analyse des prédictions des structures secondaires montre que des éléments *Cis*, représentés par deux structures en tige-boucle, sont conservés dans les régions 3'UTRs de la calpastatine de plusieurs espèces.

L'étude de la stabilité des ARNms de la calpastatine a montré que ces derniers sont très stables (une demi-vie de 8 à 10 heures) et qu'ils ne sont pas grandement affectés par le type de région 3'UTRs qu'ils contiennent. Aussi, la demi-vie de ces ARNms est affectée soit par leurs propre traduction ou par la synthèse de facteurs protéiques, puisque l'inhibition de la traduction résulte en une augmentation de leur demi-vie.

Les expériences de gel de retardement ont montré que la région 3'UTR II (segment C et A) montre une interaction avec quatre protéines cytoplasmiques que nous avons

nommées, CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39, CASTRBP26. Une seule interaction a été observée par expériences de gel de retardement lorsque le segment C (commun à toutes les régions 3'UTRs) a été utilisé. Cette interaction est probablement due à la formation du complexe CASTRBP84-segment C. Les expériences de gel de retardement montrent que les protéines CASTRBP84, CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 ne lient pas l'ARN correspondant au segment A. Ainsi, la protéine CASTRBP84 lie le 3'UTR II sur un site localisé au niveau du segment C. Alors que l'interaction des protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 avec le 3'UTR II nécessite l'utilisation du 3'UTR II complet. Le site de liaison de ces protéines est probablement constitué de séquences appartenant aux segments C et A.

Le segment B montre une interaction avec la protéine CASTRBP84. Ces protéines sont présentes dans deux autres lignées cellulaires humaines. Les expériences de gel de retardement et de buvardage de type Northwestern montrent que les interactions observées sont spécifiques aux régions 3'UTRs de la calpastatine.

Nous avons vérifié aussi si les protéines CASTRBP49, CASTRBP39 et CASTRBP26 peuvent représenter la protéine La et ses deux formes dégradées. Nous avons ainsi produit la protéine La recombinante pour l'utiliser dans des expériences de gel de retardement et de buvardage de type northwestern. La protéine La ne montre aucune interaction avec la région 3'UTR II lors des expériences de gel de retardement. Par contre, une faible interaction a été observée par expériences de buvardage de type Northwestern. Cependant, il est bien connu que l'interaction de la protéine La avec plusieurs ARNs dépend de son état de phosphorylation. Il serait donc important de

répéter ces expériences avec la protéine La recombinante phosphorylée. Des purifications biochimiques seront nécessaires pour caractériser la protéine CASTRBP84.

Remerciements

J'aimerais remercier Dr Henri Ménard pour m'avoir donné la chance de travailler dans son laboratoire et surtout de m'avoir donné l'opportunité et la liberté de travailler sur un sujet si intéressant. Je remercie Carole Richard pour sa patience et pour son support.

Je remercie Julie Leblond pour m'avoir supporté tout le long de ma maîtrise ainsi que pour son aide. Je remercie Maryse Gendron et Francis Brière pour leur aide et leurs conseils. Aussi, je remercie Dr Benoit Chabot pour ses conseils.

Finalement, je remercie ma famille pour tout leur support et leur encouragement.

Références

Azarian, S.M., King, A.J., Hallett, M.A., et Williams, D.S. (1995). Selective proteolysis of arrestin by calpain. Molecular characteristics and its effect on rhodopsin dephosphorylation. *J Biol Chem* 270: 24375-24384.

Banno, Y., Nakashima, S., Hachiya, T., et Nozawa, Y. (1995). Endogenous cleavage of phospholipase C beta 3 by agonist-induced activation of calpain in human platelets. *J Biol Chem* 270: 4318-4324.

Belotserkovskii B. P. et Johnston B. H. (1997). A random-walk model for retardation of interaction species during gel electrophoresis: implications for gel-shift assays. *Biophysical J* 73: 1288-1298.

Brown SB. (1997). Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem J* 323: 233-237.

Buzby JS, Lee SM, Van Winkle P, DeMaria CT, Brewer G, Cairo MS. (1996). Increased granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA instability in cord versus adult mononuclear cells is translation-dependent and associated with increased levels of A + U-rich element binding factor. *Blood* 88:8 2889-97

Carafoli E. et Molinari M. (1998). Calpain : A protease in search of a function. BBRC 247: 193-203.

Carolyn J D. et Roy P. (1995). Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. Curr Opin Cell Biol 7 : 386-392.

Chen C-YA. et Chen T. (1994). Interplay of two functionally and structurally distinct domains of the c-fos AU-rich elements specifies its mRNA-destabilizing function. Mol Cell Biol 14 416-426.

Colgan D. F. et Manley J. L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. Gene Dev 11: 2755-2766.

Coller J. M., Gray N. K. et Wickens M. P. (1998). MRNA stabilization by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation. Gene Dev 12: 3226-3235.

Cottin, P., et Ducastaing, A. (1994). Rat myoblast fusion requires exteriorized m-calpain activity. Eur J Cell Biol: 320-327.

Croall DE, et DeMartino GN. (1984). Comparison of two calcium-dependent proteinases from bovine heart. Biochim Biophys Acta 788:348-355.

Croall DE, et DeMartino GN. (1991). Calcium-activated neutral protease (calpain) system : structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 71:813-847.

Croall DE, et McGrody KS. (1994). Domain structure of calpain : mapping the binding site for calpastatin. *Biochemistry* 33: 13223-13230.

Croall DE, Morrow JS, et DeMartino GN. (1986). Limited proteolysis of the erythrocyte membrane skeleton by calcium-dependent proteinases. *Biochim Biophys Acta* 882: 287-296.

David LL, Shearer TR, et Shih M. (1993). Sequence analysis of lens beta-crystallins suggests involvement of calpain in cataract formation. *J Biol Chem* 268:1937-1940.

Day D. A. et Tuite M. F. (1998). Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol* 157: 361-371.

De Tullio R., Sparatore B., Salamino F., Melloni E. et Pontremoli S. (1998). Rat brain contain multiple mRNAs for calpastatin. *FEBS Letters* 422 : 113-117.

Draper D. E. (1995). Protein-RNA recognition. *Annu. Rev. Biochem* 64 : 593-620.

Edward K. L., Chan. et Eng M. Tan. (1987). Human autoantibody-reactive epitopes of SS-B/La are highly conserved in comparison with epitopes recognised by murine monoclonal antibodies. *J Exp Med* 166:1627-1640.

Edward K. L., Chan., Kevin F. Sullivan. et Eng M. Tan. (1989). Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding. *Nucleic Acids Res* 17 (6): 2233-2244.

Elce J.S., Hegadorn C, Arthur JS.C. (1997). Autolysis, Ca^{2+} requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J Biol Chem* 272:1711268-75.

Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Imahori K, Suzuki K. (1987). Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:113590-4.

Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Imahori, K. et Suzuki, K. (1987). Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 3590-3594.

Emori, Y., Kawasaki, H., Imajoh, S., Minami, Y. et Suzuki, K. (1988). All four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease independently retain inhibitory activity. Expression of the cDNA fragments in *E.coli*. *J Biol Chem* 263: 2364-2370.

Esser, R.E., Angelo, R.A., Murphey, M.D., Watts, L.M., Thornburg, L.P., Palmer, J.T., Talhouk, J.W. et Smith, R.E. (1994). Cysteine proteinase inhibitors decrease articular cartilage and bone destruction in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 37 : 236-247.

Frankel A. D. et Smith C. A. (1998). Induced folding in RNA-protein recognition: more than a simple molecular handshake. *Cell* 92: 149-151.

Fujimori Y, Shimizu K, Suzuki K, Nakagawa Y, Yamamoto S, Yamamuro T. (1994). Immunohistochemical demonstration of calcium-dependent cysteine proteinase (calpain) in collagen-induced arthritis in mice. *J Rheumatol* 53:2 72-5.

Fukui, I., Tanaka, K. et Murachi, T. (1989). Extracellular appearance of calpain and calpastatin in the synovial fluid of the knee joint. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 162 : 559-566.

Graveley B. R., Fleming E. S. et Gilmartin G. M. (1996). RNA structure is a critical determinant of poly(A) Site Recognition by Cleavage and polyadenylation specificity factor. *Mol Cell Biol* 16 (9): 4942-4951.

Gregoriou, M., willis, A.C., Pearson, M.A., et Crawford, C. (1994). The calpain cleavage sites in the epidermal growth factor kinase domain. *Eur J Biochem* 223: 455-464.

Gretchen Edwalds-Gilbert., Kristen L. et Christine M. (1997). A lternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end?. *Nucleic Acid Res* 25 (13): 2547-2561.

Heise T., Guidotti L.G. et Chisari F.V. (1999). La autoantigen specifically recognizes a predicted stem-loop in hepatitis B virus RNA. *J Virol* 73 (7): 5767-5776.

Herasse M., Fougereousse F., Stockholm D., Beckman J. et Richard I. (1999). Calpaïne 3 et dystrophie musculaire des ceintures de type 2A. *Médecine/Sciences* 15 : 1428-34.

Huet, G, Flipo, R.M., Colin, C., Janin, A., Hemon, B., Collyn-D'Hooghe, Lafyatis, R., Duquesnoy, B., et Degand, P. (1992). S timulation o f t he secretion o f latent c ysteine proteinase activity by tumor necrosis factor α and interleukin-1. *Arthritis Rheum.* 36: 772-780.

Ichiyoshi Y, Endo H, Yamamoto M. (1987). Length polymorphism in the 3' noncoding region of rat hepatic alpha 2u-globulin mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 910:1 43-51.

Ishida S., Emori Y. Et Suzuki K. (1991). Rat calpastatin has diverged primary sequence from other mammalin calpastatin but retains functionally important sequences. *Biochim Biophys Acta.* 1088: 436-438.

Walker J., De Melo Neto O. et Standart N. (1998). Gel retardation and UV-crosslinking assays to detect specific RNA-protein interactions in the 5' or 3' UTRs of translationally regulated mRNAs. *Method Mol Biol* 77: 365-378.

James, P., Vorherr, T., Krebs, J., Morelli, A., Castello, G., McCormick, D.J., Penniston, J.T., De Flora, A., et Carafoli, E. (1989). Modulation of erythrocyte Ca^{2+} -ATPase by selective calpain cleavage of the calmodulin-binding domain. *J Biol Chem* 264: 8289-8296.

Jansen R. P. (1999). RNA-cytoskeletal associations. *FASEB J* 13: 455-466.

Jeffrey M., Nicola K. et Marvin P. (1998). mRNA stabilisation by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation. *Genes & development* 12: 3226-3235.

Jehoshua O., Ravid A., Liberman U. A., Reichart J., Glaser T. et Koren R. (1998). Upregulation of calcium-dependent protease, calpain, during keratinocyte differentiation. *Brit J Dermatol*. 139: 950-957.

Kapprell H. P. et Goll D. E. (1989). Effect of Ca^{2+} on binding of the calpains to calpastatin. *J Biol Chem*. 264 (30): 17888-17896.

Kawasaki H., Emori Y. et Suzuki K. (1993). Calpastatin has two distinct sites for interaction with calpain- effect of calpastatin fragments on the binding of calpain to membranes. Arch Biochem Biophys 305 (2) :467-472.

Kawasaki, H., Emori, Y., Imajoh-Ohmi, S., Minami, Y., et Suzuki, K. (1989). Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for calcium-dependent protease. J Biochem (Tokyo) 106: 274-281.

Kishimoto, A., Mikawa, K., Hashimoto, K., Yasuda, I., Tanaka, S., Tominaga, M., Kuroda, T., et Nishizuka, Y. (1989). Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). J Biol Chem 264: 4088-4092.

Laroia G., Cuesta R., Brewer G. et Schneider R. (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. Science 284: 499-502.

Lee, W.J., Ma, H., Takano, E., Yang, H.Q., Hatanaka, M. et Maki, M. (1992). Molecular diversity in amino-terminal domains of human calpastatin by exon skipping. J Biol Chem 267: 8437-8442.

Liebhaber S. A. (1997). mRNA stability and the control of gene expression. Nucleic Acid Res Symposium Series 36: 29-32.

Lin, G.D., Chattopadhyay, D., Maki, M., Wang, K.K., Carson, M., Jin, L., Yuen, P.W., Takano, E., Hatanaka, M., DeLucas, L.J., et Narayana, S.V. (1997). Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9 Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding. *Nature Struct Biol* 4: 539-547.

Lin, Y., Brown, K., et Siebenlist, U. (1995). Activation of NF- κ B requires proteolysis of the inhibitor I κ B- α : signal induced phosphorylation of I- κ B- α alone does not release active NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 552-556.

Ma H, Shih M, Throneberg DB, David LL, Shearer TR. (1997). Changes in calpain II mRNA in young rat lens during maturation and cataract formation. *Exp Eye Res* 64:3 437-45.

Ma H, Yang HQ, Takano E, Hatanaka M, Maki M. (1994). Amino-terminal conserved region in proteinase inhibitor domain of calpastatin potentiates its calpain inhibitory activity by interacting with calmodulin-like domain of the proteinase. *J Biol Chem* 269:39 24430-6.

Maki M, Takano E, Osawa T, Ooi T, Murachi T, Hatanaka M. (1988). Analysis of structure-function relationship of pig calpastatin by expression of mutated cDNAs in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 263:21 10254-61.

Mattaj I. W. (1990). A selective review of RNA-protein interactions in eukaryotes. *Mol Biol Rep* 14: 151-155.

McCarthy J. E. G. et Kollmus H. (1995). Cytoplasmic mRNA-protein interactions in eukaryotic gene expression. TIBS 20: 191-197.

McLaren R. S., Cruccio N. et Ross J. (1997). Human La protein : a stabilizer of Histone mRNA. Mol and Cell Biol 17 (6): 3028-3036.

Mellgren RL. (1997). Evidence for participation of a calpain-like cysteine protease in cell cycle progression through late G1 phase. Biochem Bioph Res Co 236:3 555-8.

Mellgren R.L., Song k", et Mericle M.T. (1993). Calpain requires DNA for activity on nuclear proteins at low calcium concentrations. J Biol Chem 268:1 653-7.

Melloni E., De Tullio R., Averna M., Tedesco I., Salamino F., Sparatore B. et Pontremoli S. (1998). Properties of calpastatin forms in rat brain. FEBS Letters 431: 55-58.

Melloni E., Michetti., Salamino., Sparatore B. et Pontremoli S. (1998). Mechanism of action of a new component of the Ca^{2+} - dependent proteolytic system in rat brain : the calpain activator. . . Biochem Bioph Res Co 249: 583-588.

Ménard HA, et El-Amine M. (1996). The calpain-calpastatin system in rheumatoid arthritis. Immunol Today 17: 545-547.

Meyer SL, Bozyczko-Coyne D, Mallya SK, Spais CM, Bihovsky R, Kaywooya JK, Lang DM, Scott RW, Siman R. (1996). Biologically active monomeric and heterodimeric recombinant human calpain I produced using the baculovirus expression system. *Biochem J* 314 (Pt 2): 511-9.

Nath R. (1996). Effect of calpain and ICE-like protease inhibitors on neuronal apoptosis. *NeuroReport* 8: 249-256.

O'Reilly L. A. et Strasser A. (1999). Apoptosis and autoimmune disease. *Inflamm. Res* 48: 5-21.

Ono Y, Sorimachi H, et Suzuki K (1998). Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease. *Biochem Bioph Res Co* 245: 289-294.

Pain S., Monstero-Lastres A., Faler H., Brohard-B B., Fraiz N., Bachelot-loza C., Cano E. et Rendu F. (1999). Calpain controls the balance between protein tyrosine kinase and tyrosine phosphatase activities during platelet activation. *FEBS Letters* 453: 119-123.

Pörn-Ares M., Samali A. et Orrenius S. (1998). Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell death and Differentiation* 5: 1028-1033.

Ross J. (1996). Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. *TIG* 12 (5): 171-175.

Ruiz-Vela A., Buitrago G. et Martinez-A C. (1999). Implication of calpain in caspase activation during B cell clonal deletion. *EMBO J* 18 (18) : 4988-4998.

Russell J. E., Morales J. et Liebhaber S. A. (1997). The role of mRNA stability in the control of globin gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 57: 249-287.

Sagesser R., Martinez E., Tsagris M. et Tabler M. (1997). Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of cDNA expression library. *Nucleic Acid Res* 25 (19): 3816-3822.

Saido TC, Shibata M, Takenawa T, Murofushi H, Suzuki K. Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. (1992). *J Biol Chem* 267: 24585-90.

Saito K, Elce JS, Hamos JE, et Nixon RA. (1993). Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2628-2632.

Salamino F, De Tullio R, Mengotti P, Melloni E, Pontremoli S. (1994). Differential regulation of mu- and m-calpain in rat hearts perfused with Ca^{2+} and cAMP. *Biochem Biophys Res Commun* 202:3 1197-203.

Salamino F, De Tullio R, Michetti M, Mengotti P, Melloni E, Pontremoli S. (1994). Modulation of calpastatin specificity in rat tissues by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 199:3 1326-32.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.

Sarin A. (1995). A protease-dependent TCR-induced death pathway in mature lymphocytes. *J. immunol* 154 : 5806-5812.

Sato S., Hasegawa M., Nagaoka T., Takamatsu Y., Yazawa N., Ihn H., Kikuchi K. et Takehara K. (1998). Autoantibodies against calpastatine in sera of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatology* 25: 2135-9.

Shaw G. et Kamen R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*. 46(5):659-667.

Siomi H. et Dreyfuss G. (1997). RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 7: 345-353.

Sorimachi H, Ishiura S, et Suzuki K. (1997). Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* 328: 721-732.

Spencer MJ, Croall DE, et Tidball JG. (1995). Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem* 270: 10909-10914.

Squier M., Sehnert A., Sellins K., Malkinson A., Takano E. et Cohen J. (1999) Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J Cell Physiol* 178: 311-319.

Squier MK., (1994). Calpain activation in apoptosis. *J. Cell. Physiol* 159: 229-237.

Sureau, A. et Perbal, B. (1994). Several mRNAs with variable 3' untranslated regions and different stability encode the human PR264/SC35 splicing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 932-936.

Suzuki K, Shimizu K, Hamamoto T, Nakagawa Y, Murachi T, et Yamamuro T. (1992). Characterization of proteoglycan degradation by calpain. *Biochem J*;285: 857-862.

Suzuki K. et Sorimachi H. (1998). A novel aspect of calpain activation. *FEBS Letters* 433: 1-4.

Suzuki K., Sorimachi H., Yoshizawa T., Kinbara K., Ishiura S. (1995). Calpain: novel family members, activation, and physiological function. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* (376): 523-529.

Szomor Z, Shimizu K, Fujimori Y, Yamamoto S, Yamamuro T. (1995). Appearance of calpain correlates with arthritis and cartilage destruction in collagen induced arthritic knee joints of mice. *Ann Rheum Dis* 54: 477-483.

Takano J., Kawamura T., Murase M., Hitomi K. et Maki M. (1999). Structure of mouse calpastatin isoforms : implication of species-common and species-specific alternative splicing. *Biochem Biophys Res Co* 260: 339-345.

Tsubata, T., et Takahashi, K. (1989). Limited proteolysis of bovine myelin basic protein by calcium-dependent proteinase from bovine spinal cord. *J Biochem (Tokyo)* 105: 23-28.

Uemori T, Shimojo T, Asada K, Asano T, Kimizuka F, Kato I, Maki M, Hatanaka M, Murachi T, et Hanzawa H. (1990). Characterization of a functional domain of human calpastatin. *Biochem Biophys Res Commun* 166: 1485-1493.

Valcárcel J. et Gebauer F. (1997). Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. *Current Biology*. 7: R705-R708.

Vanags DM. (1996). Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J. Biol.Chem* 271: 31075-31085.

- Varani B. (1997). RNA-protein recognition during RNA maturation and development. *Nucleic Acid Res Symp Series* 36: 36-38.
- Vilei E. M., Calderara S, Anagli J, Berardi S, Hitomi K, Maki M, Carafoli E. (1997). Functional properties of recombinant calpain I and of mutants lacking domains III and IV of the catalytic subunit. *J Biol Chem* 272:41 25802-8.
- Villa P.G., Henzel W.J., Sensenbrenner M., Henderson C.E. et Pettman B. (1998). Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *J Cell Sci* 111: 713- 722.
- Wang L.F., Wei S.G., Miao S.Y., Liu Q.Y., Koide S.S. (1994). Calpastatin gene in human testis. *Biochem Mol Biol Int* 33:2 245-51.
- Wang X., Kiledjian M., Weiss I. M. Et Liebhaber S. A. (1995). Detection and characterization of a 3' untranslated region ribonucleoprotein complex associated with human α -globin mRNA stability. *Mol Cell Biol* 15 (3): 1769-1777.
- Wells S.E., Hillner P.E., Vale R.D., Sachs A.B. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* 2:1 135-40.
- Whale E. et Keller W. (1993). RNA-protein interactions in mRNA 3'-end formation. *Mol Biol Rep* 18 : 157-161.

Wood D.E., Thomas A., Devi LA., Berman Y., Beavis RC., Reed JC. et Newcomb E.W. (1998). Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogen* 17: 1069-1078.

Yamamoto S, Shimizu K, Shimizu K, Suzuki K, Nakagawa Y, et Yamamuro T. (1992). Calcium-dependent cysteine proteinase (calpain) in human arthritic synovial joints. *Arthritis Rheum* 35: 1309-1317.

Zehner ZE, Shepherd RK, Gabryszuk J, Fu TF, Al-Ali M, Holmes WM. (1997). RNA-protein interactions within the 3' untranslated region of vimentin mRNA. *Nucleic Acids Res* 25:16 3362-70.

Zhang W, Lu Q, Xie ZJ, Mellgren RL. (1997). Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Tyr diazomethyl ketone: evidence that cleavage of p53 by a calpain-like protease is necessary for G1 to S-phase transition. *Oncogene* 14:3 255-63.